

浮遊珪藻の休眠孢子形成と代謝物質に関する研究

著者	奥 修
学位授与機関	東京水産大学
学位授与年度	1996
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00000745/

浮遊珪藻の休眠孢子形成と代謝物質に関する研究

平成8年度
(1996)

東京水産大学大学院
水産学研究科
海洋生産学専攻

奥 修



目次

第1章 緒論

1.1	海洋環境における珪藻研究の意義・重要性	1
1) 1)	基礎生産に果たす珪藻の役割	1
2) 2)	物質循環の担い手としての珪藻の役割	2
3) 3)	珪藻の季節的消長	3
4) 4)	休眠孢子研究の意義	4
1.2	休眠孢子形成研究の経緯	5
1) 1)	休眠孢子的形態的特徴と孢子形成種	5
a) 1)	休眠孢子的形態	5
b) 1)	孢子形成種	5
2) 2)	現場における休眠孢子的観察	5
a) 2)	水域における分布状況	5
b) 2)	鉛直的分布・フラックス	6
3) 3)	休眠孢子形成を誘導する環境因子	7
a) 3)	培養実験による研究	7
b) 3)	現場観測による研究	8
4) 4)	休眠孢子を発芽に導く環境因子	8
5) 5)	環境変動への耐性	9
a) 5)	温度・光条件	9
b) 5)	微量金属に対する耐性	9
c) 5)	物理的強度	10
6) 6)	休眠孢子的代謝物質組成	10
1.3	本研究の目的	11

第2章 休眠孢子形成種の探索 13

2.1 はじめに 13

2.2	実験方法	13
1)	珪藻の単離	13
2)	休眠孢子形成実験	17
2.3	結果と考察	17
2.3.1	珪藻種の選定	17
1)	珪藻の分離と維持	17
2)	単離珪藻の休眠孢子形成特性	20
3)	珪藻種の選定	20
2.3.2	高塩分と窒素欠乏により誘導される休眠孢子形成	21
1)	はじめに	21
2)	増殖と孢子形成に及ぼす塩分の影響	21
2.4	まとめ	26
第3章	珪藻細胞中の光合成色素とヌクレオチド分析法の確立	27
3.1	はじめに	27
3.2	材料と方法	27
1)	試薬・標準物質	27
2)	機器構成	28
3)	色素分析	28
4)	ヌクレオチド分析	32
3.3	結果と考察	34
3.3.1	光合成色素の分析	34
1)	逆相HPLC法による光合成色素のクロマトグラム	34
2)	無傷葉緑体の分離方法の応用	34
3)	分析精度	40
3.3.2	珪藻細胞中のヌクレオチドの分析	43
1)	溶出溶媒の検討	43
2)	トリクロロ酢酸（TCA）抽出物の中和法の検討	45
3)	分析精度および試料の分析	48

3.4	まとめ	52
第4章	休眠孢子形成に伴う細胞内リン組成の変化	53
4.1	はじめに	53
4.2	材料と方法	54
1)	培養実験方法	54
2)	測定項目及び分析法	56
4.3	結果と考察	58
1)	栄養増殖と休眠孢子形成	58
2)	栄養塩の同化とその比率	61
3)	細胞あたりの栄養塩含量	64
4)	細胞内リン組成	65
5)	今後の課題	68
4.4	まとめ	70
第5章	休眠孢子の光合成色素とヌクレオチド組成	71
5.1	はじめに	71
5.2	材料と方法	72
1)	培養実験方法	72
2)	各要素の分析方法	72
3)	発芽実験	73
5.3	実験結果	73
1)	各栄養条件における増殖曲線と栄養吸収特性	73
2)	細胞収穫時における各培養系の栄養塩取り込み比 と細胞の形態	75
3)	光合成色素の含量と組成	79
4)	単位クロロフィル当たりの <i>in vivo</i> クロロフィル蛍光	80
5)	ヌクレオチド類の含量と組成	80

6)	休眠孢子における光合成色素組成の日変化	84
7)	光照射強度と色素組成	88
8)	明条件における休眠孢子の生き残りと発芽	89
a)	休眠孢子と栄養欠乏細胞の生き残り特性	89
b)	Xanthophyll cycleの存在の有無	89
c)	発芽特性	89
5.4	考察	93
1)	孢子形成に伴う単位クロロフィル当たりの <i>in vivo</i> クロロフィル蛍光の変化	93
2)	珪藻におけるXanthophyll cycle	94
3)	細胞内ヌクレオチド組成	98
a)	ATP, ADP, AMP	98
b)	ADPG	99
4)	クロロフィル当たりの <i>in vivo</i> 蛍光, Xanthophyll 色素組成, ヌクレオチド含量の関連	103
5)	高温・明条件における耐久性の獲得	103
5.5	まとめ	106
第6章	まとめと展望	107
6.1	本研究の展開と主要な成果	107
6.2	休眠孢子の生理生化学的性質	110
6.3	仮説の再検討と今後の展望	112
1)	従来 of 仮説の見直し	112
2)	今後の展望	112
	謝辞	116
	引用文献	117

第1章 緒論

海洋における基礎生産・物質循環系に果たす珪藻の役割と重要性、さらに種の維持・保存、並びに分布・消長を研究してゆく上での休眠孢子の存在意義に言及した。加えて、休眠孢子形成に関する今日までの研究状況を総括することによって、今後において取り組むべき研究課題を整理し、本論文の方向性を提示した。

1. 1 海洋環境における珪藻研究の意義・重要性

1) 基礎生産に果たす珪藻の役割

植物は太陽エネルギーを化学エネルギーに変換し、他の生物に受け渡し可能な物質を生産する（基礎生産）。ここで生産された物質が地球上のすべての生態系を支えている。海は地球表面積の70%強を占めていることを考えると、そこに棲息する植物プランクトンが地球上の基礎生産や物質循環に果たす役割は小さくない。したがって、海洋の基礎生産活動を活発にし、生産を高めることは、人間を含めた高次消費者の潜在扶養力を増すために重要であるといえよう。

珪藻類は植物プランクトンの代表とも言うべき分類群であり、海洋における基礎生産の主要な担い手である。例えば、Werner (1977) は地球上の全植物の基礎生産量の20-25%は珪藻類により占められていると見積もっている。また、最近の研究によれば、海洋の全基礎生産に占める珪藻の割合は40~50%であるが、栄養塩類が豊富に存在する沿岸や湧昇域では珪藻の基礎生産に果たす役割はさらに大きく、90%以上にも達すると見積もられている（Nelson et al. 1995）。

浮遊珪藻類のうち、*Chaetoceros*, *Coscinodiscus*, *Skeletonema*, *Thalassiosira* などの分類群に属するプランクトンは広く海洋に分布し、しかも植物プランクトンに占める量的割合も大きいことから考えると（巖佐 1976, Guillard and Kilham 1977），これらの属は生産に寄与する重要な位置づけにあるといえる。珪藻類は動物プランクトンや幼魚の餌として重要であることもよく知られている（巖佐 1976, Werner 1977）。

以上に述べてきたように、海洋の基礎生産に果たす珪藻の役割に鑑み、Platt (1971) は珪藻を「地球上で最も重要な植物」と評している。

2) 物質循環の担い手としての珪藻の役割

珪藻は他の植物プランクトンと異なり、多量の珪酸を特異的に吸収して増殖する。生体内に取り込まれた珪酸は専ら珪酸殻の形成に使用される。この珪酸殻は比重がおよそ1.5~2.0であり、海水（~1.03）よりも大きいために珪藻の沈降速度を早める方向に働く。しかも珪酸殻は細胞内の有機物を保護したまま沈降する。したがって、浮遊力を失った珪藻は物質の鉛直輸送に大きな役割を果たすことになる（Bienfang et al. 1982, Smaetacek 1985）。

海洋中の沈降粒子の総フラックスと珪藻体珪酸のフラックスの間には強い正の相関が認められており、珪藻による基礎生産が活発になると沈降粒子フラックスが増すことが示されている（例えば Noriki and Tsunogai 1986）。また、生物体珪酸の沈降フラックスの増加に伴って沈降粒子中の有機炭素／無機炭素比が上昇することから、珪藻は炭素を有機態の形で鉛直輸送しているといえる（乗木 1996）。鞭毛藻 (*Distephanus speculum* と nanoflagellates) と珪藻 (*Corethron criophilum* と small pennates) の混合群集から成る外洋域では沈降粒子フラックスが小さく ($97-138 \text{ mgC m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)、珪藻 (*Biddulphia*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira*) が優占する沿岸域では沈降粒子フラックスが大きい ($450-1400 \text{ mgC m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) という研究報告もある（von Bodungen et al. 1986）。

このような珪藻の沈降という現象は、海洋の底生生物群集への餌の供給機構としても働いていることが分かっている（Billett et al. 1983, von Bodungen et al. 1986）。珪藻が優占する海域では、底生生物は表層域から多くのエネルギー供給を受けることができ、しかも、輸送される有機物は珪酸殻に包まれた新鮮なものである。したがって、珪藻は底生生物群集を支えるエネルギー源としても重要である。

堆積物表層には多数の珪藻が見いだされており、鉛直輸送された珪藻のシンクにもなっている。例えば、瀬戸内海の表層堆積物には、 $10^5 \sim 10^6 \text{ cells cm}^{-3}$ もの密度で珪藻の生細胞が存在していることが明らかにされている（今井ら 1990, 板倉ら 1993）。また、6,150 m の深海堆積物の表層にも増殖可能な珪藻が存在していることも知られている（Marone et al. 1973）。

近年の化石燃料の大量消費に伴い、大気中の炭酸ガス濃度は増加傾向にあり、それを原因とした地球の温暖化の加速が懸念されている。珪藻による物質の鉛直

輸送能力は、この地球温暖化の防止策（案）の一つとしても注目されている。即ち、珪藻の沈降は無機炭素の一部を深海に封じ込める働きを持っているので、珪藻による基礎生産を活発にすれば表層の炭酸塩濃度が低下する。この影響で海洋／大気間の炭酸ガス平衡が溶解側に偏るので、大気中で増え続けている炭酸ガスの一部を海洋に吸収させることが可能となる。化石燃料の燃焼に伴う炭酸ガスの放出量が年間5～6 Gtであるのに対して、全海洋における基礎生産量は51Gtと見積もられているので（Martin et al. 1987）、珪藻による炭素の固定／鉛直輸送を増すことが大気中の炭酸ガス濃度の増加を抑制し、温暖化の防止機構として働くというプロセスには実現性があり、研究が続けられている。

3) 珪藻の季節的消長

珪藻による基礎生産量や物質の鉛直フラックスは時間的に大きく変化することが知られている。例えば、珪藻 *Chaetoceros* 属の出現頻度を一年以上にわたって観測した例によると、水柱の珪藻細胞数は春と秋の2回に大きく増加し、これ以外の季節では著しく低下している（Garrison 1981, Rines and Hargraves 1987）。北太平洋亜寒帯中部及びベーリング海で珪藻の鉛直物質フラックスを調べた研究では、珪藻フラックスの大きな季節変動が見いだされており、極大は4～6月の春と8～10月の夏から秋にかけて観測されている（高橋ら 1996）。このような珪藻の現存量や鉛直フラックスの季節的変動は温帯域で普通に見られる現象である。

珪藻の季節的消長を生み出す原因としては、栄養塩濃度や光強度・鉛直混合の強さ・動物プランクトンによる捕食圧の変化などが指摘されてきた（例えば Cushing 1975, Parsons et al. 1984）。ところが、最近の研究によると、水柱における珪藻類の出現の季節性は、珪藻類が生活史の一時期に形成する休眠胞子のような休眠期細胞の形成とも関連が深いことが明らかになってきた（Rines and Hargraves 1987, 高橋ら 1996）。即ち、増殖に適している環境条件下では栄養細胞として水柱で活発に増殖するが、増殖に不適当な条件下では休眠胞子として海底に沈降し、そこで一時期を過ごすという生活史を持つ珪藻の存在が考えられており、種固有の生活史が現場の水柱の珪藻の季節消長と深く関係している可能性が指摘されている。

4) 休眠孢子研究の意義

珪藻の休眠期細胞はその外部形態や生理状態により休眠細胞、休眠孢子の2つに分けられる。前者は形態学的には栄養細胞とは差異がなく、細胞質の凝集など生理学的変化のみが栄養細胞と異なる点、後者は厚い珪酸殻の存在や細胞容積の縮小などの形態学的特徴により栄養細胞と容易に区別できる点が特徴である。なお、一部の例外種を除いて、両方の細胞はともに栄養細胞から無性的に形成する。

栄養細胞と休眠細胞は形態的に区別することが困難なので、現場海域では主に休眠孢子についての研究が行われてきた。これまでに得られた休眠孢子の動態に関する知見は以下のようなものである（Garrison 1981, von Bodungen et al. 1986, Rines and Hargraves 1987, Odate and Maita 1990, 今井 1995）。

- a) 沈降粒子のフラックスに占める珪藻の割合が大きい時には休眠孢子の割合も大きい。
- b) 沿岸域の観測例では、ブルームの初期の頃よりは終期の方が栄養細胞よりも休眠孢子が多数認められる。
- c) 沿岸や内湾域のような浅い海域の堆積物中に存在する休眠孢子が鉛直混合により有光層まで運ばれてくる可能性もあるので、休眠孢子はブルーム開始の seed population になりうると考えられている。
- d) 孢子形成種が優占している間は鞭毛藻類の出現が少ない。

これらの報告は、珪藻の休眠孢子が、現場水域における珪藻の個体群動態（季節的消長・種組成・存在密度・基礎生産量・沈降フラックス）を司る大きな要因であることを示唆している。したがって、海洋の基礎生産や物質輸送、さらには生態系遷移に果たしている珪藻の役割を理解するための基礎として、休眠孢子に関するあらゆる知見の集積が必要であると考えられる。

そこで以下ではこれまでになされてきた休眠孢子に関する研究について課題別にまとめ、これから明らかにすべき課題を抽出する。

1. 2 休眠孢子形成研究の経緯

1) 休眠孢子の形態学的特徴と孢子形成種

a) 休眠孢子の形態

休眠孢子の形態的特徴には古くから興味が持たれてきた。既に1800年代後期から1900年代前半にかけての光学顕微鏡レベルでの詳細な観察により、多くの種の休眠孢子の形態的特徴が記載されている（例えば Gran 1897, Okamura 1907, Ikari 1926）。電子顕微鏡の発達に伴い、さらに微細な構造に関する研究も進んできた（Hargraves 1976, 1979, Pitcher 1990, Round et al. 1990）。それらの研究結果をまとめると、休眠孢子は概ね珪酸質のカプセルともいえるべき構造であり、栄養細胞に比べて珪酸殻の珪質化が著しいこと（Hargraves 1979, Round et al. 1990）、また多くの種の休眠孢子の被殻の表面に鋭い刺（spine）や樹状の装飾物が存在すること（Gran 1897, Cupp 1943）が大きな形態的特徴といえる。

b) 孢子形成種

Hargraves (1976) は休眠孢子を形成する種を含む分類群として、*Bacteriastrum*, *Cerataulina*, *Chaetoceros*, *Detonula*, *Ditylum*, *Fragilaria*, *Leptocylindrus*, *Melosira*, *Porosira*, *Rhizosolenia*, *Stephanopyxis*, *Thalassiosira* 属を挙げている。McQuoid and Hobson (1996) は *Eucampia*, *Meridion*, *Odontella*, *Paralia* 属にも孢子形成を行う種が存在することを報告している。*Fragilaria* 属を除けば他の全ては中心目の珪藻である。上記の属のうち、最も休眠孢子形成種が多いのは海産珪藻の最重要種群と位置づけられる *Chaetoceros* 属であり、現在までに72種の休眠孢子が確認されている（McQuoid and Hobson 1996）。

2) 現場における休眠孢子の観察

a) 水域における分布状況

休眠孢子は世界各地の海から見いだされており、ノルウェー沖（Gran 1897）、山東半島沖（Chu and Kuo 1957）、日本沿岸（Okamura 1907, Ikari 1926, 今井ら 1990, Ishizaka et al. 1987, Kuwata and Takahashi 1990）、北米西海岸（Cupp 1943, Garrison 1981）、同東海岸（Rines and Hargraves 1987, 1988）、南アフリ

カケープタウン沖 (Pitcher 1986, 1990), 南極大陸沿岸 (von Bodungen et al. 1986) などの沿岸や湧昇域から多数の報告がある。外洋では, 北東太平洋, ベーリング海 (高橋ら 1996) から報告されている。これらの報告のように, 珪藻類の休眠胞子の中～高緯度の沿岸や湧昇域で, 生産性の高い海域に多く出現する傾向を持つようである。この傾向は胞子形成種の多くの種の分布特性 (Werner 1977) と一致する。一方, 熱帯域の外洋水では, 休眠胞子形成種はあまり存在していないので, 沿岸や湧昇域から流入してくる休眠胞子がまれに見られる程度である (Hargraves and French 1983)。

b) 鉛直的分布・フラックス

休眠胞子は珪藻ブルームの終わりにかけて高濃度で見いだされることがある。例えば噴火湾の浅海域 (30~50 m) では春のブルーム終期に 10^5 spores l^{-1} もの濃度が観測されており, このときの休眠胞子の沈降フラックスは最大 10^8 spores $m^{-2} d^{-1}$ にも達していると言われている (Odate and Maita 1990)。また, 南極大陸沿岸では, 沈降してゆく珪藻のおよそ70%が休眠胞子であったとの報告もある (von Bodungen et al. 1986)。

ブルーム後の堆積物表層には休眠胞子が存在することが知られている (Hargraves 1975, Davis et al. 1980, Garrison 1981, Odate 1987, Pitcher 1986)。また, 休眠胞子は一年を通じて常に堆積物中に存在する例も知られており, その濃度は瀬戸内海の場合で 10^4 spores cm^{-3} (湿泥) と報告されている (今井ら 1990)。

堆積物中に胞子が存在することは, 冬季のような栄養細胞の増殖に不適当な期間を休眠胞子として海底で過ごし, そこで環境の回復を待つという Gran の仮説 (Gran 1897, 1912, cf. Garrison 1984) を支持している。しかし, 海底堆積物から水柱へ回帰して発芽する休眠胞子のフラックスは実測されていないので, Gran の仮説の真偽は未だに不明である。この上方向への鉛直フラックスの実測は現場海域での珪藻類の動態と休眠胞子形成との関係を知る上で重要な課題と考えられる。

3) 休眠孢子形成を誘導する環境因子

a) 培養実験による研究

休眠孢子形成は環境条件の変化への適応機構と考えられる。したがって、孢子形成を誘導する環境因子の探索は、珪藻の環境への適応性を明らかにする上で重要な課題といえる。しかし、珪藻がどのような要因によって休眠孢子を形成するかを明らかにしようとした試みは比較的新しい。このような分野の研究が立ち後れていた原因の一つは、珪藻プランクトンの室内培養技術が確立されなかったことによる。

Drebes(1966)は *S. palmeriana* の休眠孢子形成がリンの欠乏により引き起こされることを実験的に初めて明らかにした。その後、多くの研究者によって室内実験で再現性をもって休眠孢子形成の誘導ができることが実証されてきた (von Stosch et al. 1973, Durbin 1978, French and Hargraves 1980, French and Hargraves 1985, Valente et al. 1987, Kuwata and Takahashi 1990, 板倉ら 1993)。これらの多くの報告によれば *Chaetoceros*, *Leptocylindrus*, *Stephanopyxis*, *Thalassiosira* 属の休眠孢子形成は窒素欠乏のみで誘導されているので、窒素欠乏は休眠孢子形成の誘導因子として最も重要であると認識されている (cf. Hargraves and French 1983, Round et al. 1990)。

休眠孢子形成を誘導する環境因子(窒素欠乏)は、温度や光などの物理的条件と複合的に働く場合のあることが知られている。例えば、*T. nordenskiöldii* は窒素欠乏条件でしかも低温(0~5°C)で培養すると休眠孢子を形成するが、15°Cではたとえ窒素欠乏条件であっても孢子形成を行わない (Durbin 1978)。また *Ch. didymus* var. *protuberans* は窒素欠乏で休眠孢子を形成するが、窒素欠乏条件で暗条件に移すとさらに活発に孢子を形成するという興味深い現象が観察されている (板倉ら 1993)。このように、休眠孢子形成は様々な環境因子がある特定の組み合わせで作用したときに引き起こされている場合もある。現場の水域は様々な環境条件が複雑に組み合わさった場であるから、今後の研究においては、「環境因子の組み合わせ」をふまえて孢子形成の誘導因子を解明して行くことが肝要であると思われる。

b) 現場観測による研究

Garrison (1981) は、モンレー湾において珪藻の休眠孢子の消長と環境水中の栄養塩類濃度との関連を調べ、窒素濃度が低下してくると休眠孢子が多く見られるようになることを明らかにしている。板倉ら (1995) も類似した現象を瀬戸内海において観測している。このように、これらの観測例は培養実験から得られている結果とよく一致している。

一方、*Thalassiosira nordenskioeldii* の休眠孢子はブルーム初期においてすら観察されることから、この種の休眠孢子の形成は環境因子の変化とは無関係であると推測した報告もある (井上・谷口 1995)。栄養が枯渇していない南極沿岸水中で、大量の *Thalassiosira* の休眠孢子の沈降が観測された例もある (von Bodungen et al. 1986)。これらの現象は、休眠孢子形成が温度や光条件 (あるいはそれらの組み合わせ) により引き起こされているか、または環境因子に変化がなくても生物の内的な要因により孢子形成が誘導されているかのいずれかを示していると思われる。現場観測から孢子形成の環境因子を単独に抽出することは困難であるので、培養実験と現場観測を組み合わせ、多角的な視点から休眠孢子の誘導因子を究明してゆくことが大切である。

4) 休眠孢子を発芽に導く環境因子

休眠孢子を発芽に導く環境因子の探索は難しい課題である。それは、発芽実験に用いる休眠孢子の試料中に栄養細胞が共存していると、孢子が発芽したのかそれとも栄養細胞が増殖したのかという問題を含んでいるからである。この問題点を踏まえながらこれまでの研究成果をまとめると以下のようなものである。

栄養が十分な条件で培養した場合、*Chaetoceros diadema*, *Ch. didymus*, *Ch. vanheurckii* の休眠孢子は $1.3 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上の光強度で発芽が確認されている (Hollibaugh et al. 1981)。同様の結果が *Ch. didymus* var. *protuberans* についても得られている (板倉 1995)。一方、*Ch. diadema* の休眠孢子の発芽には $20 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上の比較的強い光が必要である (Hargraves and French 1983)。また、休眠孢子の発芽には光強度だけでなく光周期も関与しているとの報告もある (Eilertsen et al. 1995)。これらの実験結果はいずれも孢子の発芽に光が必須であることを示している。

一般的に *Chaetoceros* 属の休眠孢子の発芽は水温が高い方が早く起こるとされており（Hargraves and French 1983），極端に低い水温（5° C）では孢子の発芽が起こらない例も知られている（桑田・高橋 1992）。

以上の報告から，休眠孢子の発芽には光と栄養，温度条件が大きく関与しているといえる。休眠孢子の発芽条件は，休眠孢子形成の誘導因子とともに，現場水域の珪藻類の動態解析の鍵となる部分であるから様々な種について精査してゆくことが必要である。

5) 環境変動への耐性

休眠期の細胞が様々な環境に耐えることができれば，個体群の維持に有利である。珪藻の休眠孢子はこのような性質を持っているものと推測されており，温度，光，重金属，捕食の影響などの観点から検討がなされてきた。

a) 温度・光条件

休眠孢子の生き残り時間は温度と光強度に依存していることが知られている。例えば *Thalassiosira nordenskioeldii* の休眠孢子の生存期間は20°C，暗条件では7日であるが，0°Cの場合には576日に達することが観察されている（Durbin 1978）。また，*Chaetoceros diadema* と *Leptocylindrus danicus* の休眠孢子の寿命は高温・明条件（ $20 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）よりも低温・暗条件でより長いことも知られている（Hargraves and French 1983）。海底堆積物中の休眠孢子は，実験室内で低温（11° C）・暗条件で3年間保存した後でも，栄養・光・温度条件が満たされれば発芽することが確認されている（今井ら 1990）。以上の報告から判断すれば，休眠孢子は低温・暗条件の海底堆積物上で長期間生き残る可能性が高いといえる。このことは，休眠孢子が seed population としての役割を持つことを強く示唆しているといえよう。

b) 微量元素に対する耐性

休眠孢子は栄養細胞よりも高濃度の微量元素に対して抵抗性を持っている。例えば，*Chaetoceros protuberans* の休眠孢子は高濃度の銅（ $\text{pCu} = 8.6$ ）で100日間曝露しても生き残る（Valente et al. 1987）。しかし，休眠孢子形成は Cd の

存在で阻害されるという報告 (Sanders and Cibik 1985) もあることから、胞子形成が微量金属濃度の変化に対する適応となるかどうかは明らかではない。

c) 物理的強度

休眠胞子は栄養細胞に比べて著しく厚い珪酸の被殻を持つために、動物プランクトンに摂餌されても消化されずに生きたまま排出される場合のあることが知られている (Hargraves and French 1983)。この性質は個体群密度が低下し、かつ補食圧が高まってきたときの種の維持に役立っていると考えられる。

また、休眠胞子は栄養細胞よりも乾燥に強いことも知られている (Hargraves 1975)。しかし、乾燥に耐える能力は最大でも *Chaetoceros teres* の120分であり、aerial transport が可能かどうかはわかっていない。

6) 休眠胞子の代謝物質組成

休眠は生物が環境条件に対する耐久性を獲得して増殖に不適當な期間を乗り切り、個体群を維持してゆくための重要な過程である (藤伊 1975)。休眠は、生育や代謝の活性を極端に低下させた状態と定義され (今堀・山川 1984)、代謝の活性の低下と耐久性の獲得には深い関係のあることが知られている。このようなことから、休眠胞子形成という現象の理解には代謝に関する知見を細胞内物質の組成などから得てゆくことが必要であると考えられる。しかし、栄養細胞と休眠胞子の細胞内物質の含量や組成を比較研究した報告は非常に少なく、得られているデータは元素組成のレベルに留まっている。その理由は休眠胞子を培養条件で純粋に得ることが難しいためである。ともあれ現在までに得られている知見をまとめると以下のようなものである。

栄養細胞に比べて休眠胞子の細胞当たりの炭素含量が多いこと (5~15倍)、また呼吸速度は遅くなる傾向のあることが中心目珪藻5種について知られている (French and Hargraves 1980)。*Thalassiosira antarctica* の休眠胞子 (形成後約10日、全細胞の約70%) では、細胞当たりの炭素含量は栄養細胞の1.3倍であり、この状態は暗条件に一ヶ月保存した場合でも変化しないことが報告されている (Doucette and Fryxell 1983)。栄養細胞と比較した場合、*Chaetoceros pseudocurvisetus* の休眠胞子 (96%) の呼吸活性は1/10、光合成活性は1/30にまで

低下していたことが確認されている。また、このような状態の休眠孢子の炭水化物の主成分は、グルコースにより構成されるポリサッカライドであることが確認されている（Kuwata et al. 1993）。このように、休眠孢子は多くの貯蔵エネルギーを蓄える一方で、生理的な活性を低下させているようである。

しかし、休眠孢子の化学組成に言及した報告は今までのところ上の3件だけであり、休眠孢子が実際に「休眠」状態にあるのかどうかを傍証するデータは著しく不足している状況にある。エネルギー状態、光合成の量子収率、色素組成、酵素活性、各種の代謝産物組成といった生理学的指標となるようなデータを休眠孢子について蓄積してゆくことは、休眠孢子の生態学的役割を解明してゆく上で重要な課題である。

1. 3 本研究の目的

前節では休眠孢子の今日までの研究例について概観してきたが、これらの研究の多くは形態学的な特徴や水域における分布に関するものであって、孢子形成を誘導する環境因子、休眠孢子の発芽因子や環境条件の変化への耐久性、さらに代謝物質の含量及び組成といった研究課題を取り扱った例は極めて少ないことが指摘できよう。。

細胞の増殖や休眠特性は生理的機構と密接に関連しているので、休眠孢子の機能・役割の解析には、地理的・季節的分布や形態学的特徴に関するこれまでの知見に加えて、代謝物質の組成や生理的な活性といった生理生化学面からの情報が必要*である。このようなことから、休眠孢子と栄養細胞の代謝物質の含量と組成を調べ、両者がどのような点で異なっているのかを明らかにすることは、休眠孢子の機能・役割を解明してゆく上で意義があると考えられる。

本論文では休眠孢子の形成に伴う細胞内の代謝物質の含量及び組成の変化と、休眠孢子の耐久性の獲得・生き残りとの関係を研究することとした。研究の対象とした代謝物質は、以下に示す理由で各種リン化合物、光合成色素、ヌクレオチ

* このことは陸上植物の休眠（種子など）に関する研究を見るとよく理解できる。例えば、ヌクレオチドなどの中間代謝物質、植物ホルモン、脂質やデンプンなどの貯蔵物質、酵素系など様々な生化学成分の側面からの研究が行われた結果、種子の機能・役割に関する数多くの知見が得られている（例えば、藤伊 1975）。

ド類とした。

リン酸化合物： リン酸は生命活動にとってきわめて重要な化合物の一つであり、タンパク合成、遺伝、光合成、窒素固定など生命過程の様々な局面において極めて重要な役割を果たしている。リン酸化合物の細胞内濃度は細胞の生理状態によって様々に変化することが知られており（Sawada et al. 1989, Sawada 1990, 臼田 1995），とりわけ細胞の休眠過程とリン酸化合物の代謝は密接な関係がある（Hall and Hodges 1966, Mukherji et al. 1971, 藤伊 1975）。

光合成色素： 植物の光合成活性は蛍光収率や光合成色素量などと深く関わっており（Demmig et al. 1989, Thayer and Bjorkman 1990, Demers et al. 1991），植物はこれらの要素を変化させることにより自らの光合成活性を調節し、様々な光条件に適応していると考えられている。このような適応様式は珪藻を始めとした植物プランクトンの栄養細胞では広く知られている（Sakshaug et al. 1987, Latasa 1995）。

ヌクレオチド類： 光合成活性や呼吸速度などの生理学的指標の変化は、細胞内の ATP 含量に反映されることが鞭毛藻の休眠シスト形成で知られていることから考えて、（Binder and Anderson 1990, Lirdwitayaprasit et al. 1990），珪藻の休眠胞子の ATP 含量が細胞のエネルギー状態を知る指標になるといえよう。

研究は以下のように進めた。まず、相模湾表層水から分離した中心目珪藻 *Chaetoceros* 属11種の休眠胞子形成特性を栄養条件に着目して調べ、栄養枯渇環境下で休眠胞子を形成しやすい珪藻を選別した（第2章）。選別した実験対象種を用い、光合成色素とヌクレオチドの分析法の確立を試みた（第3章）。各種環境パラメータが制御された室内培養系を設定し、休眠胞子形成に伴う各種代謝物質の細胞含量及び組成の変化を栄養細胞との比較において明らかにした（第4, 5章）。一連の研究から得られた成果をまとめ、今後の展望を示して本論文の結びとした（第6章）。

第2章 休眠孢子形成種の探索

2. 1 はじめに

休眠孢子と栄養細胞の代謝物質組成の比較検討のためには、休眠孢子と栄養細胞をできるだけ純粋に得る必要がある。この目的のためには、培養しやすく、かつ休眠孢子を形成しやすい珪藻を実験材料として選ぶことが大切である。そこで本章では、このような性質を持つ珪藻種を明らかにすることを試みた。

休眠孢子を形成する珪藻としては、*Bacteriastrum*, *Cerataulina*, *Chaetoceros*, *Detonula*, *Ditylum*, *Fragilaria*, *Leptocylindrus*, *Melosira*, *Porosira*, *Rhizosolenia*, *Stephanopyxis*, *Thalassiosira* などが代表的な属として知られている（第1章, Hargraves 1976, McQuoid and Hobson 1996）。本研究では、種類数も生物量も多く、世界中の海洋に普通に見られ、海洋植物プランクトンの最重要種群（Rines and Hargraves 1988, 谷口 1992）といわれている *Chaetoceros* 属を対象生物とした。まず、相模湾表層水から多種類の *Chaetoceros* 属の珪藻を分離し、維持培養が容易な種を探した。次にこれらの珪藻の孢子形成特性を栄養欠乏条件に着目して調べ、休眠孢子を形成しやすい種の探索を試みた。

2. 2 実験方法

1) 珪藻の単離

相模湾（34°51'N, 139°32'E, Fig. 2.1）から1992年 5, 7月にポリカーボネート培養瓶に表層水を採取し、これに f/20 に相当する栄養塩（窒素制限になるように改変した f 培養液, cf. Guillard and Ryther 1962）を添加して研究室に持ち帰り、速やかに温度 20° C, 14L:10D の光条件の培養庫で保存した。培養 2-5 日後、増殖してきた珪藻 1 群体を実体顕微鏡下でマイクロピペット法により分離し、f/10 培養液の入った試験管に接種した。分離した珪藻は前述の温度・光条件で培養した（Fig. 2.2）。ここで増殖が確認された珪藻について、再び同様の操作で分離を繰り返し、クローン株とした。得られたクローン株は f/2 ~ f/4 培地を用い、温度 16 ~ 18° C, 光強度 40 ~ 70 $\mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で維持培養した。

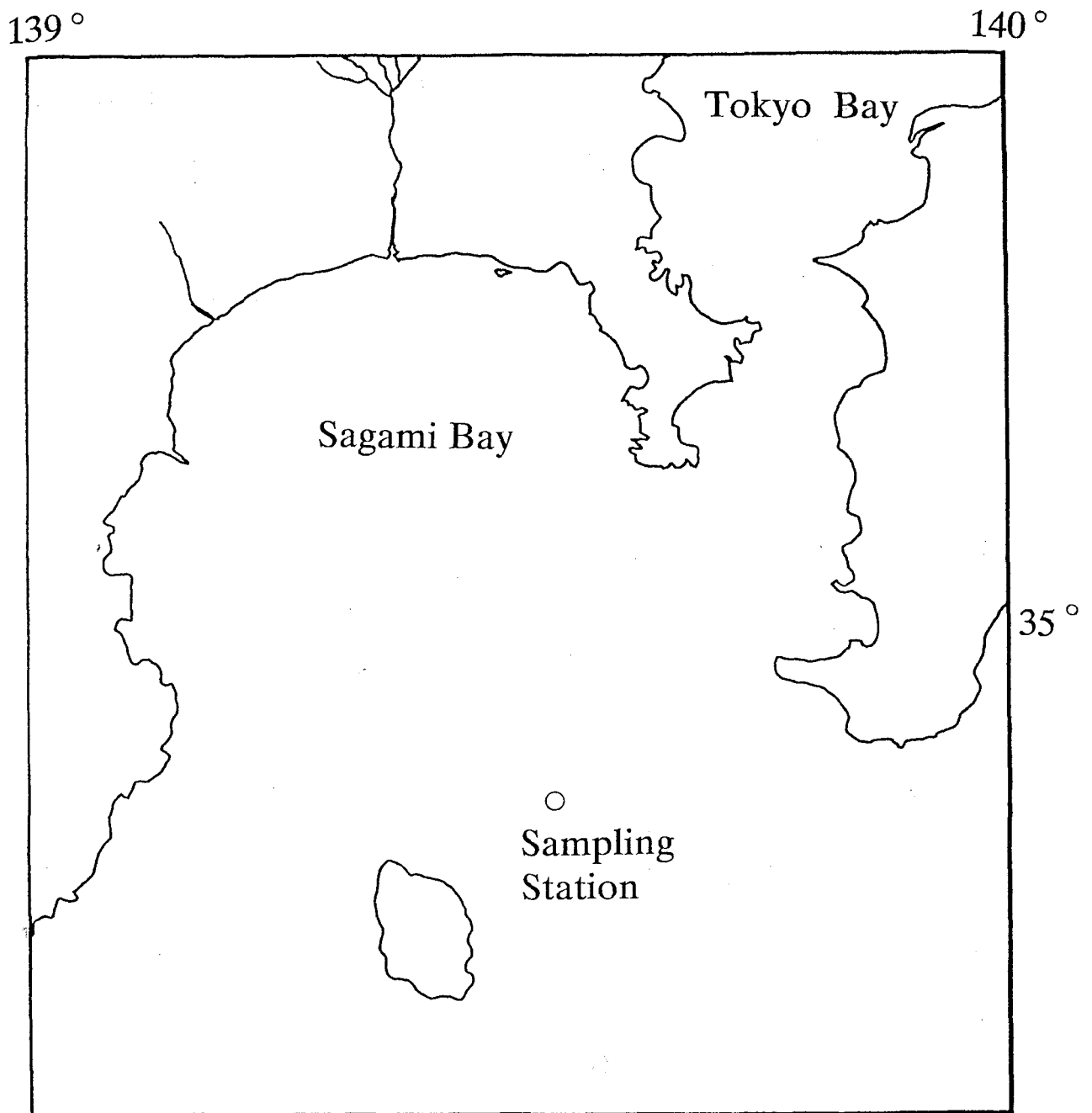


Figure 2. 1. Sampling location of Sagami Bay surface water.

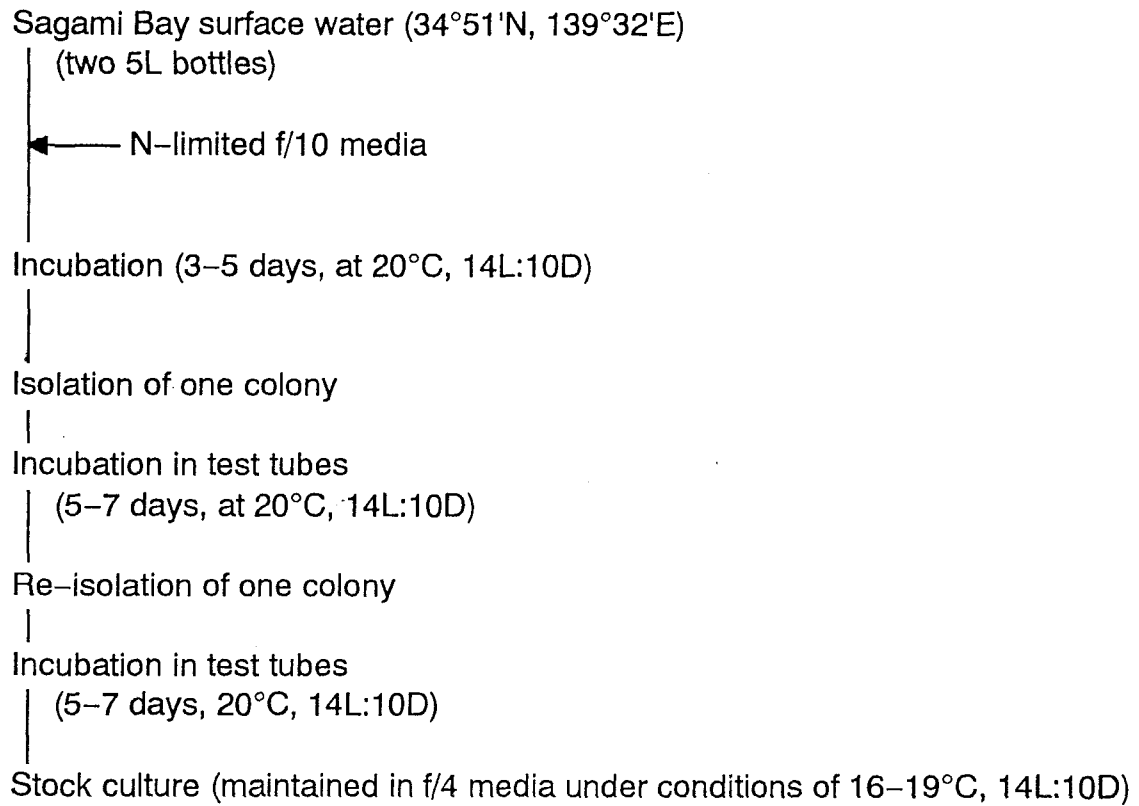
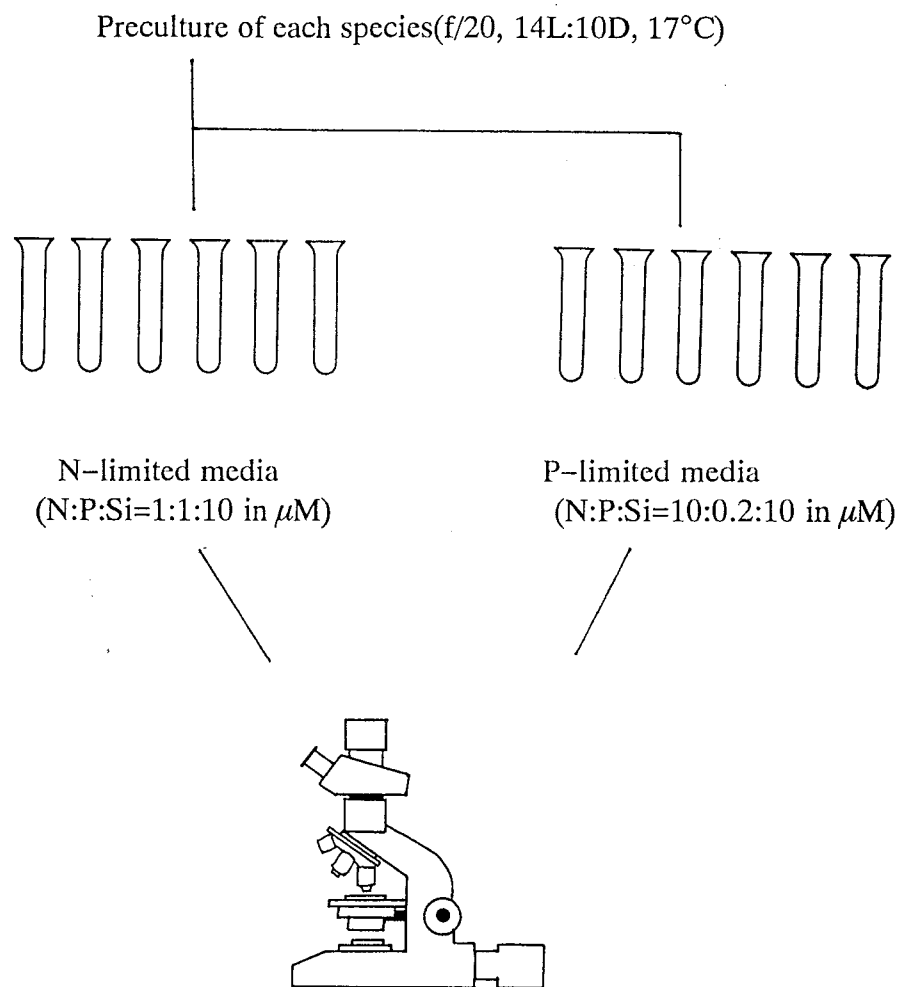


Figure 2.2 Isolation method for *Chaetoceros* species taken from Sagami Bay surface water.



Cell counting on the 6th day and 9th day after inoculation.
300–1200 cells were counted.

Figure 2. 3. Method for experiments of resting spore formation

2) 休眠孢子形成実験

まず、以下の栄養塩類組成の異なる培地を調製し、これを用いて休眠孢子的形成の有無を調べた。窒素欠乏培地： $N:P:Si = 1:1:10$ (μM)、リン欠乏培地： $N:P:Si = 10:0.2:10$ (μM)。いずれの培地も微量金属混合液 ($f/2$ metal) とビタミンの濃度は $f/100$ レベルとした。 $f/20$ 培地による各クローンの予備培養から、5ml の栄養欠乏培地が入った試験管に珪藻株を接種し、維持培養と同じ条件で培養した (Fig. 2.3)。接種後2~4日の間は活発な増殖が見られ、各試験管中の珪藻は浮遊する傾向が認められた。珪藻接種後約5日目に藻体の沈積が確認されたので、定常期に移行したと判断し、6日目と9日目にそれぞれ検鏡した。試料は通常の水封プレパラートの形で検鏡した。光学顕微鏡は日本光学製 SFR-Ke を使い、プランアクロマート ($N.A. = 0.25$ または 0.65) を装着して明視野ないしは暗視野照明法で検鏡した。それぞれの試料について300から1200細胞を計数し、全細胞数に占める休眠孢子的の割合を算出した。

2. 3 結果と考察

2. 3. 1 珪藻種の選定

1) 珪藻の分離と維持

分離した珪藻は *Chaetoceros* 属明刺類の11種11株である (Table 2.1)。これらの種はすべて休眠孢子的を形成することが知られている (cf. Okamura 1907, Ikari 1926, Cupp 1943, Chu and Kuo 1957, Rines and Hargraves 1988)。

11種のいずれの珪藻も $f/2$ 培地でよく増殖し、維持可能であった。しかし、何株かは維持培養を続けるにつれて、外見的に色素は薄く、細胞幅は狭く、しかも植え継ぎ後の増殖が不活発となってきた。とりわけ、*Ch. affinis*, *Ch. compressus*, *Ch. coronatus*, *Ch. costatus*, *Ch. didymus* var. *protuberans*, *Ch. laciniosus*, *Ch. lorenzianus* の7種がこのような状態に至りやすかった (Table 2.1)。一方、*Ch. anastomosans*, *Ch. debilis*, *Ch. paradoxus*, *Ch. pseudocurvisetus* の培養株の状態は常に良好であることが多く、比較的容易に株を維持できることが分かった。

Table 2.1. Stability of maintenance and observed auxospore of *Chaetoceros* species isolated from Sagami Bay.

Species	Stability of culture	Auxospore formation
<i>Chaetoceros affinis</i>	unstable	rare
<i>Ch. anastomosans</i>	stable	frequent
<i>Ch. compressus</i>	unstable	none
<i>Ch. coronatus</i>	unstable	rare
<i>Ch. costatus</i>	unstable	none
<i>Ch. debilis</i>	stable	rare
<i>Ch. didymus</i> var. <i>protuberans</i>	unstable	rare
<i>Ch. laciniosus</i>	unstable	none
<i>Ch. lorenzianus</i>	unstable	rare
<i>Ch. paradoxus</i>	unstable	none
<i>Ch. pseudocurvisetus</i>	stable	rare

Table 2.2. Percentages of resting spores in clonal batch culture under N-limited or P-limited media. 300 – 1200 cells were counted in each culture.

Species	Resting spores (%)			
	N-limited culture		P-limited culture	
	Day 6	Day 10	Day 6	Day 10
<i>Chaetoceros affinis</i>	0	0.1	0	0
<i>Ch. anastomosans</i>	0	0	0	0
<i>Ch. compressus</i>	32.4	54.0	17.4	49.7
<i>Ch. coronatus</i>	4.6	7.1	30.1	53.3
<i>Ch. costatus</i>	5.7	24.1	36.4	33.3
<i>Ch. debilis</i>	0.2	6.8	1.2	5.6
<i>Ch. didymus</i> var. <i>protuberans</i>	0	0	0	0
<i>Ch. laciniosus</i>	50.8	32.6	0.1	7.1
<i>Ch. lorenzianus</i>	11.6	14.4	33.4	25.4
<i>Ch. paradoxus</i>	0	0	0	0
<i>Ch. pseudocurvisetus</i>	15.4	19.3	20.0	41.9

増大胞子形成は珪藻の生活環の一時期で起こる、狭くなった細胞サイズの回復（増大）の過程である（例えば Round et al. 1990）。したがって、培養株中に増大胞子が存在し、かつ栄養細胞サイズの増大が確認できれば、珪藻の生活環が滞りなく回転していることがわかる。6 ヶ月の維持培養期間において、増大胞子と栄養細胞サイズの回復が観察された種は、*Ch. affinis*, *Ch. anastomosans*, *Ch. coronatus*, *Ch. didymus* var. *protuberans*, *Ch. lorenzianus*, *Ch. debilis*, *Ch. pseudocurvisetus* の7 種であった（Table 2.1）。

2) 単離珪藻の休眠胞子形成特性

単離株の休眠胞子形成特性を Table 2.2 に示した。休眠胞子形成を誘導する栄養欠乏条件は種によって異なり、いくつかのカテゴリーに整理することが可能であった。即ち、窒素あるいはリンの欠乏により高い割合で胞子形成を行う *Ch. pseudocurvisetus*, *Ch. costatus*, *Ch. lorenzianus*, *Ch. laciniosus*, *Ch. coronatus*。栄養枯渇条件下では休眠胞子が全く見られないグループとして *Ch. paradoxus*, *Ch. didymus* var. *protuberans*。また、*Ch. affinis*, *Ch. anastomosans* のように休眠胞子を極めて作りにくいグループ、最後にこれらのどれに属するのか判別が難しい *Ch. debilis*, *Ch. compressus* の4グループに分けられた。

3) 珪藻種の選定

1) 株の維持が比較的容易である、2) 生活環が完結している、3) 休眠胞子形成を行いやすい、という条件を満たしている珪藻が休眠胞子の生理生化学的性質の研究に最も適している。この3条件を完全に満足させる種は、*Ch. pseudocurvisetus* のみであったので、この種を論文の研究材料に用いることとした。この種は暖海の沿岸域に普通に見られる珪藻であり、季節的な出現特性は他の *Chaetoceros* 種と類似しているので（Ikari 1926, Cupp 1943, Rines and Hargraves 1987, 高野 1990）、沿岸域での休眠胞子の役割を考える上での代表種としても実験生物に適していると判断した。

培養9 日目の時点における *Ch. pseudocurvisetus* の休眠胞子形成率は窒素欠乏条件で約20%、リン欠乏条件で約40%であった。これらの値は胞子の生化学組成の測定のためには十分ではない。しかし、この珪藻の胞子形成率は細胞の状態に

より変化し、細胞幅が広いときには休眠孢子の形成は活発であることを予備実験で確認している。そこで *Ch. pseudocurvisetus* の維持培養株を複数用意し、細胞の状態が良好な株を実験に使用することにした。

2. 3. 2 高塩分と窒素欠乏により誘導される休眠孢子形成

1) はじめに

休眠孢子形成は、栄養増殖に不適当な期間を生き残るための生活応答と考えられているので (Hargraves and French 1983, Ishizaka et al. 1987, Kuwata and Takahashi 1990), 孢子形成の誘導因子を探索することは環境条件の変化に対する珪藻の適応性を知る上で意義がある。しかし、これまでの研究の多くは孢子形成の誘導因子として栄養欠乏にのみ着目しており、他の環境因子 (水温・塩分・光・他感作用物質・微量栄養塩など) が孢子形成の誘導因子になるのかどうかは不明のままである。

ここでは、リンや窒素の欠乏のみでは休眠孢子をほとんど形成しなかった *Chaetoceros anastomosans* が高塩分条件で窒素欠乏になると休眠孢子を形成することを示す。

2) 増殖と孢子形成に及ぼす塩分の影響

種々の塩分で調製した窒素制限培地 (N:P:Si=10:10:100, in μM) で培養した場合の孢子形成特性を Fig. 2.4 に示す (窒素源は硝酸塩の形で加えてある)。 *Ch. anastomosans* は塩分 6.9, 13.8 では全く増殖しなかったが、20.7~48.2 の広い塩分範囲での増殖が確認された (Fig. 2.4A)。しかし、培養 24 日目の時点で、20.7 と 27.8 の塩分条件では栄養細胞のほとんどは死んでおり、Fig. 2.5F に見られるように珪藻の殻のみが残っていた。一方、高塩分の培養系の栄養細胞数は $10^4 \text{ cells ml}^{-1}$ に達した。これらの細胞の多くはサイトプラズムを持っていたので、生きていられる (Fig. 2.5 B)。この珪藻はより高い塩分 (48.2) でもわずかに増殖したが、そのほとんどは奇形細胞であった (Fig. 2.5 C)。

この珪藻の休眠孢子形成は広い塩分範囲で見られたが、孢子形成に適した塩分

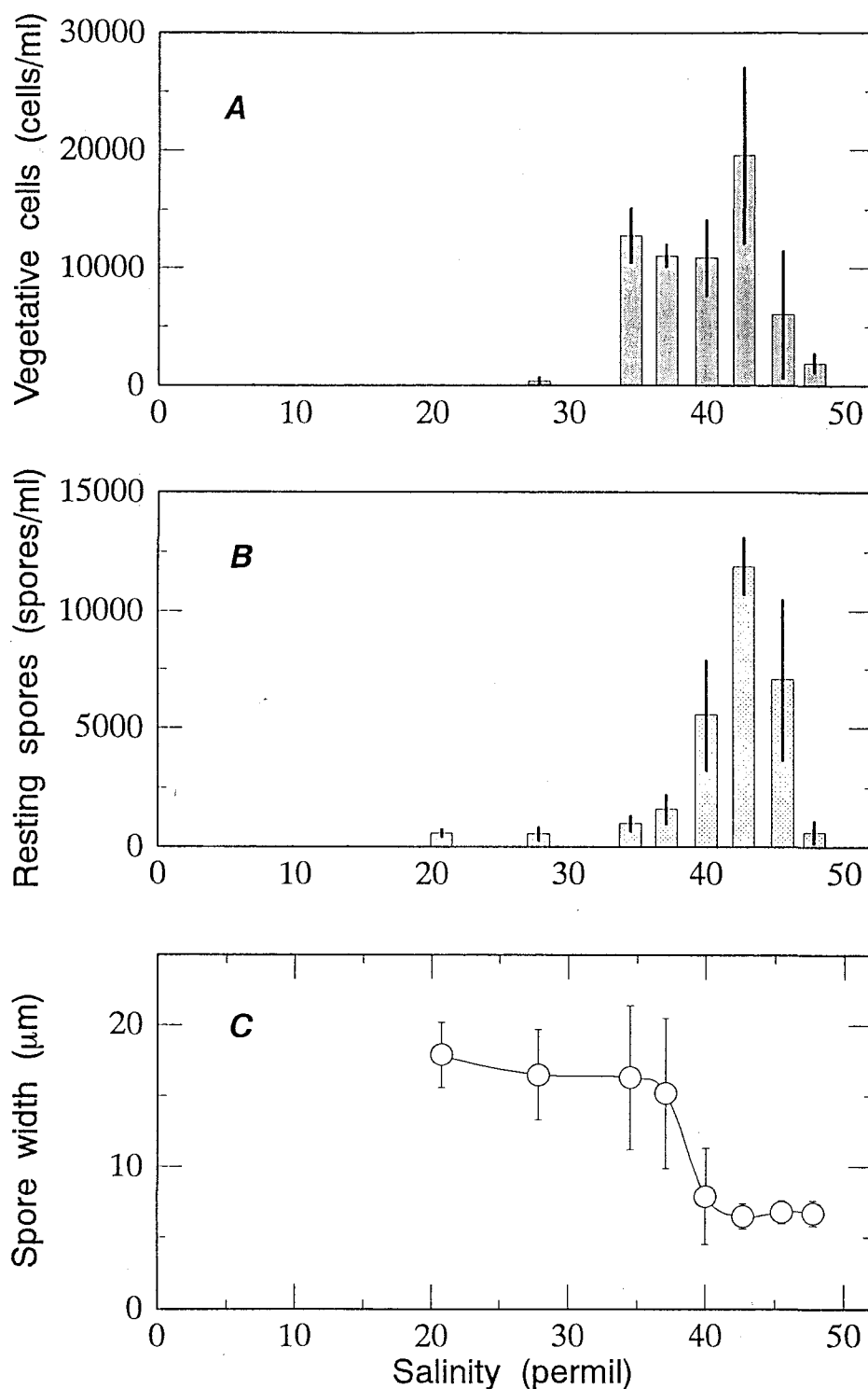


Figure 2. 4. Concentrations of (A) vegetative cells, (B) resting spores of *Chaetoceros anastomosans* and relationship between salinity and (C) cell diameter in media of various salinities on the 24th day after inoculation in experiment 1. Error bars in (A) and (B) are 1 sd of the mean of triplicates. Error bars in (C) are 1 sd of the mean of 27 – 30 measurements. Only live materials are shown. Vegetative growth was also observed in the cultures with low salinities ($S = 20.7$ ppt and 27.8 ppt), however, the cells all died by the 24th day.

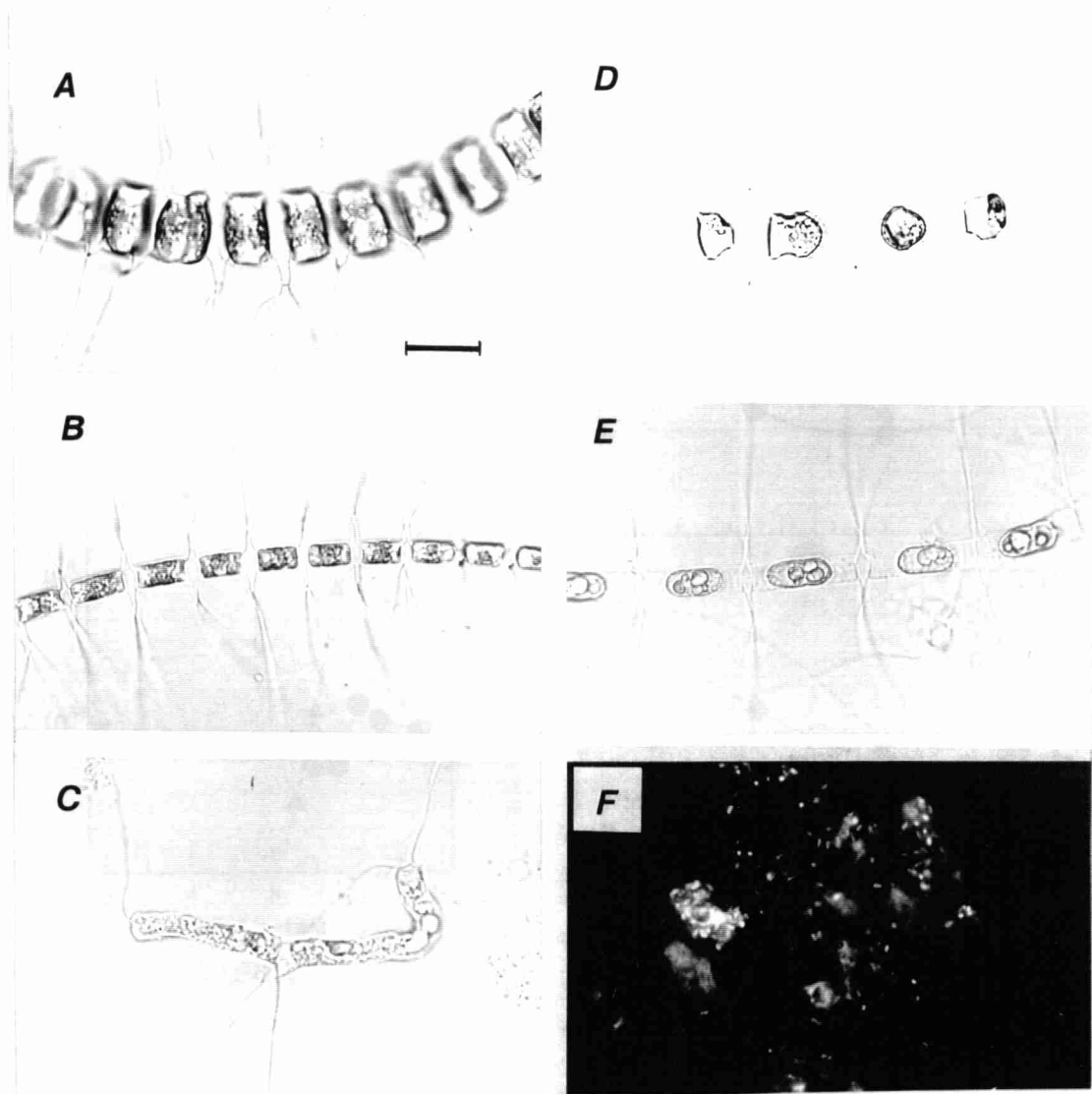


Figure 2. 5. Light micrographs of typical cell types observed in experiment 1 using clonal culture of *Chaetoceros anastomosans*. (A) Wide, and (B) narrow vegetative cells; (C) deformed vegetative cells observed in high salinity cultures; (D) large and (E) small resting spores; (F) dead (empty) vegetative cells, killed by attack from attached bacteria. A–E : bright field. F: dark field. Scale bar = 20 μm .

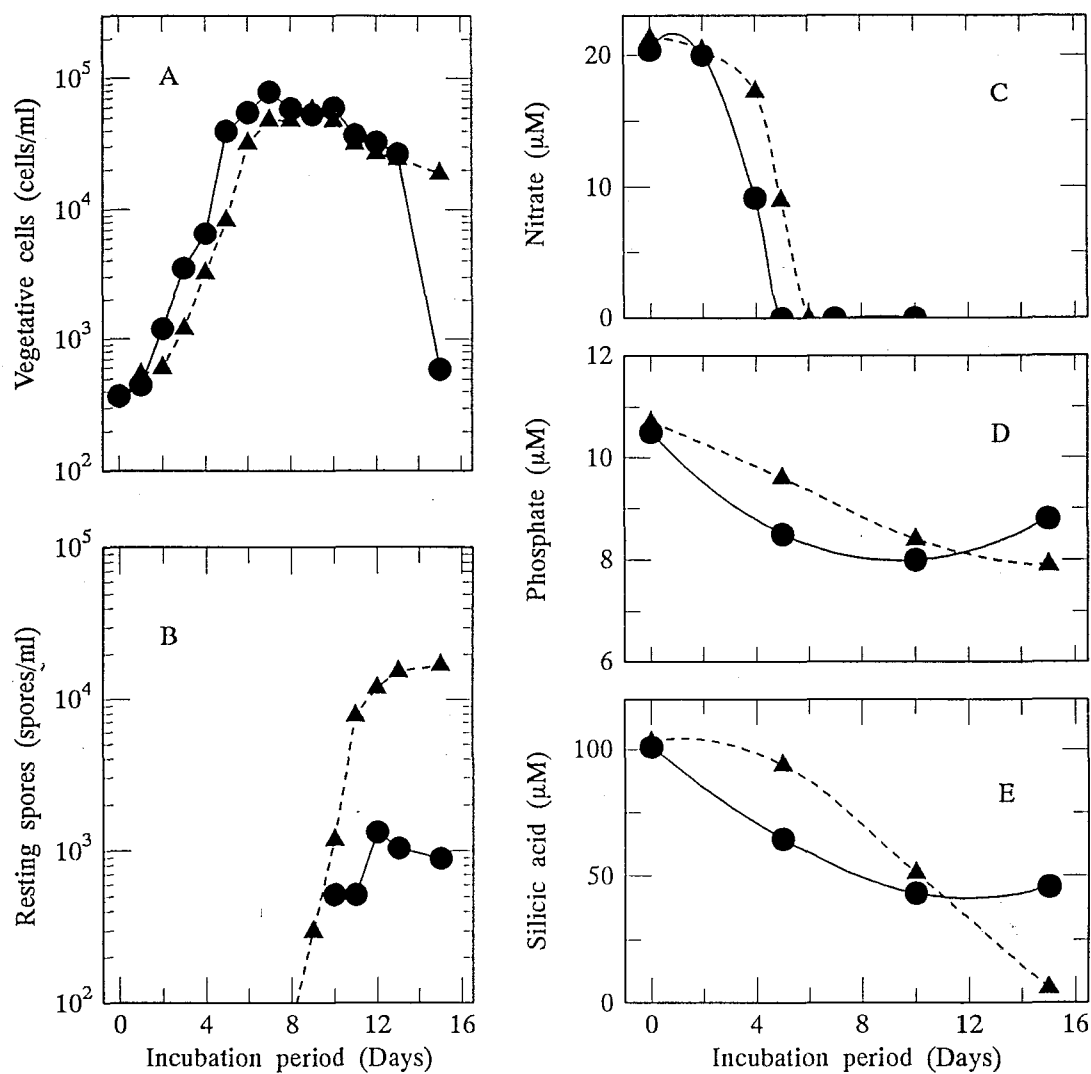


Figure 2. 6. Time course changes in concentrations of (A) vegetative cells, (B) resting spores, (C) nitrate, (D) phosphate and (E) silicic acid in batch cultures under nitrogen limitation with salinity of 34.5 ppt (circle) or 42.7 ppt (triangle).

は高塩分側に偏っており（Fig. 2.4B），休眠孢子が最も多く見られたのは塩分42.7の条件であった。この実験で変化させた環境パラメータは塩分のみであるから，*Ch. anastomosans* の休眠孢子形成は高塩分条件で窒素が欠乏したときに活発になることが明らかである。

休眠孢子の細胞幅は塩分条件により大きく異なっていた。即ち，高塩分条件下での休眠孢子の細胞幅は約8 μm と著しく小さい（Fig. 2.5 E）のに対して，通常の塩分かあるいはそれ以下の塩分で形成した休眠孢子の細胞幅は平均で16 μm と相対的に大きかった（Fig. 2.5 D）。塩分条件によって形成する休眠孢子のサイズが異なるということは興味深いが，その理由は明らかではない。

塩分の異なる条件下での，栄養消費と休眠孢子形成過程との関係を調べるために，相模湾で普通に見られる塩分（34.5）と，この珪藻の孢子形成が最も活発であった塩分（42.7）で窒素制限培地によるバッチ培養を行った（Fig. 2.6）。その結果，高塩分条件では硝酸塩の枯渇に伴い急速な休眠孢子形成が見られ，休眠孢子は最大 $1.7 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$ にまで増えた。一方，塩分34.5の培養系では硝酸塩の枯渇後も孢子形成は不活発であり，休眠孢子は $10^3 \text{ cells ml}^{-1}$ にとどまった。増殖曲線からわかるように，高塩分条件での休眠孢子の形成速度は，通常の塩分のときの栄養増殖に匹敵する大きさであった。

高塩分条件で形成した休眠孢子を通常の塩分で調製した f/2 培養液に接種し，20°C，で $100 \mu\text{m Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ，14L:10D の条件下で培養したところ，発芽・増殖が確認された（データは示していない）。この休眠孢子はさらに高い塩分にも耐え，塩分50.4で10日間という過酷な環境条件でも生き残ることも確認された。

以上の実験結果から，高塩分条件と窒素欠乏の組み合わせが，珪藻 *Ch. anastomosans* の休眠孢子形成を効果的に誘導する因子であることが分かった。このことは，この珪藻が高塩分海域での窒素欠乏という過酷な環境下に対する適応能力を持っていることを示唆している。しかし実際にこの珪藻が高塩分海域（地中海や紅海，アラビア湾など）に分布し，窒素欠乏に伴って孢子形成を行っているかどうかは不明である。

2. 4 まとめ

本章では珪藻の休眠胞子の代謝物質含量・組成の測定に先立ち、培養が比較的容易であり、胞子形成を行いやすい珪藻種を明らかにすることを試みた。その結果、*Chaetoceros pseudocurvisetus* が培養実験に適している珪藻であると判断された。

また、副次的ではあるが、高塩分と窒素欠乏により休眠胞子を形成する珪藻、*Chaetoceros anastomosans* の存在が明らかになった。このような種の存在は、珪藻の環境への適応能力の広いことを示していることから、胞子形成が栄養欠乏に対する生活史応答であるという従来の考え方を見直す必要がある。

第3章 珪藻細胞中の光合成色素とヌクレオチドの分析法の確立

3. 1 はじめに

細胞内の生化学成分の組成は生物の種類により大きく異なっている。例えば、緑藻、鞭毛藻、珪藻では、それぞれの分類群に含まれる光合成色素の種類、組成も異なっていることが知られている（千原・西澤 1979）。Chl. *a* を始めとした生化学成分の多くは極めて不安定であり、分解しやすい。これらの物質の分解のしやすさは、実験条件は勿論のことながら、生体内の酵素活性にも強く支配されるが、酵素活性は生物の種や細胞の生理状態によってもまた大きく異なる。このような事情から、生体内の生化学成分の正確な分析を行うためには、対象とする生物と定量する物質に対して理想的な分析方法を確立することが望ましい。

そこで本章では珪藻 *Ch. pseudocurvisetus* の光合成色素とヌクレオチド類を HPLC を用いて分析する場合の最も適した分析条件について検討し、簡便な操作で迅速に分析できる方法の確立を試みた。

3. 2 材料と方法

1) 試薬・標準物質*

分析に用いる試薬は原則として JIS 特級の規格を満たすものとした。HPLC 分析には HPLC グレードの試薬を用いた。メタノール、アセトン、アセトニトリル、テトラブチルアンモニウムヒドロキシド、酢酸アンモニウム、リン酸一ナトリウム、UDP、UDP-glucose (UDPG) は和光純薬（大阪）の製品、ATP、ADP、AMP、NADP⁺、NADPH は（株）オリエンタル酵母の製品、また Chl. *a*、ADP-glucose (ADPG) は Sigma 社の製品を用いた。

* 略号は以下の通り。ADP: adenosine 5'-diphosphate, ADPG: adenosine 5'-diphosphate glucose, AMP: adenosine 5'-monophosphate, ATP: adenosine 5'-triphosphate, NADP⁺: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (酸化型), NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (還元型), UDP: uridine 5'-diphosphate, UDPG: uridine 5'-diphosphate glucose, UTP: uridine 5'-triphosphate

Chl. $c_1 + c_2$, Fucoxanthin については、褐藻 *Sargassum ringgoldianum* HARVEY のアセトン抽出物より HPLC 法で分取したものを標準試料とした。Diadinoxanthin と Diatoxanthin は標準物質として使用する量を入手・調製することが困難であったので、以下の手順により吸光係数を求め、定量に用いるデータとした。まず、*Ch. pseudocurvisetus* の栄養細胞から光合成色素をアセトンで抽出した。この抽出物から Diadinoxanthin と Diatoxanthin を HPLC 法で（ごく微量）分取した。分取試料を窒素気流下で 5~10 μ l まで濃縮し、超ミクロ石英セルを用いてこれらの色素の吸光スペクトルを測定した。このデータを用いて、Bidigare (1991) が示した吸光係数との比較により 436 nm の吸光係数を算出した。このようにして求めた吸光係数を定量に使用した（Fig. 3.1）。

2) 機器構成

HPLC 分析システムのダイアグラムを Fig. 3.2 に示した。このシステムはカラム、カラムオープン、検出器以外は全て共通であり、対象物質によりカラムを交換して使用した。HPLC ポンプは L-6000（日立）にレオダイン製サンプルインジェクター（モデル 7125）を装着したものを用了。また、ヌクレオチドの分析にはカラムオープン 655A-52（日立）を用いた。ヌクレオチドには紫外線分光光度計（UVIDEC-Ⅲ，日本分光），色素分析には可視分光光度計（UV-140-01，島津製作所）をそれぞれピーク検出に使用した。ピーク面積の計算には D-2500 型クロマトインテグレーター（日立）を用いた。

3) 色素分析

逆相 HPLC 法による色素分析のフローシートを Fig. 3.3 に示す。本分析法は Suzuki et al. (1993) の方法をベースにして、Wright et al. (1991) を参考にしながら、多少の改良を加えた。分析手順は以下の通りである。

珪藻を含む培養液約 200 ml をグラスファイバーフィルター（GF/C）を用いて減圧濾過し、珪藻を GF/C 上に集めた。濾過終了後、5 秒以内に氷で冷却した乳鉢中の 100% アセトンにこの GF/C を浸し、直ちにすり潰した。破碎した GF/C をアセトンで遠沈管に洗い込み、遠心分離した（3000 rpm で 4 分間）。生じた上澄み液を HPLC 分析に供した。HPLC 分析は以下の手順で行った：サンプル 20 μ l

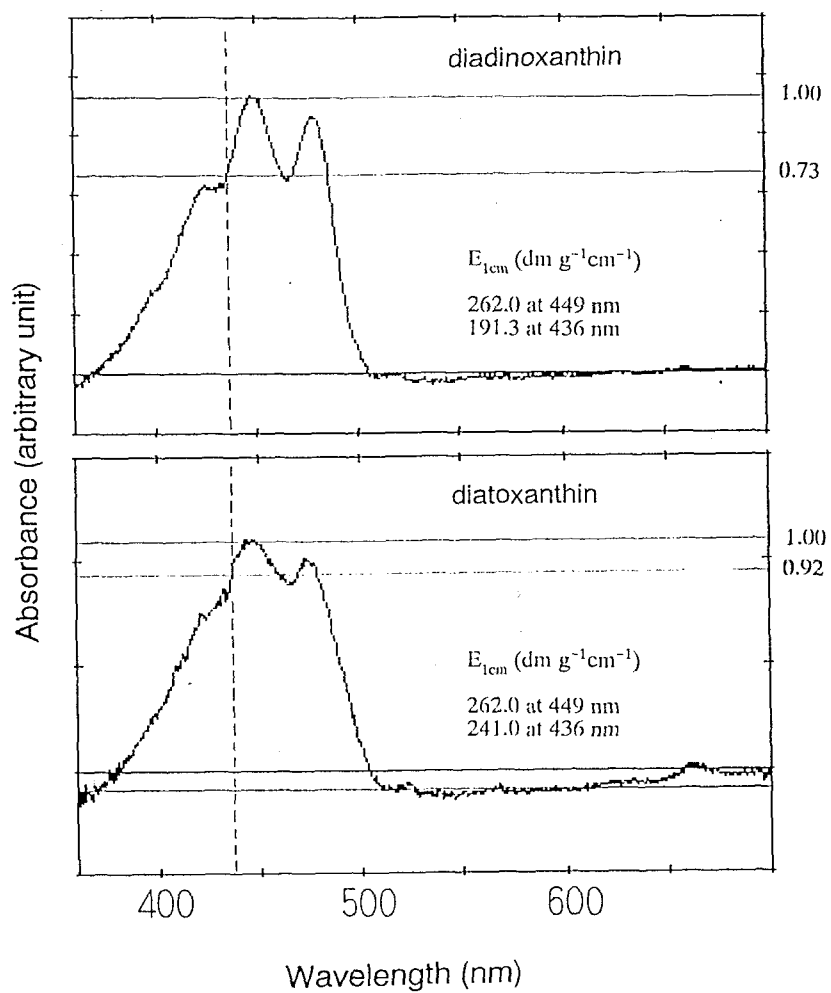


Figure 3. 1. Absorption spectra of diadinoxanthin and diatoxanthin in the diatom *Chaetoceros pseudocurvisetus*. Each pigment is purified by HPLC.

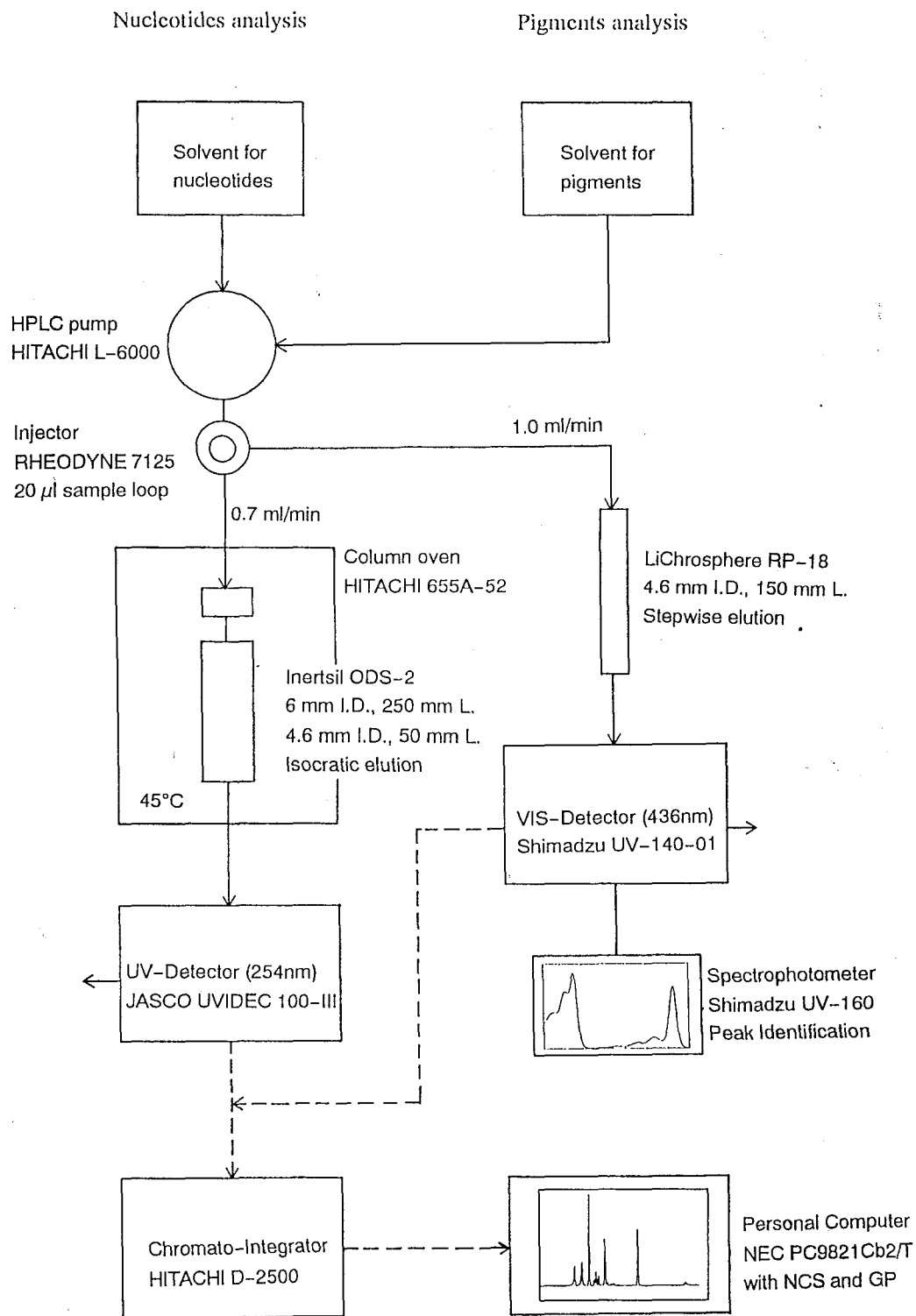


Figure 3. 2. Schematic diagram of the chromatographic system for determinations of nucleotides and photosynthetic pigments in the diatom, *Chaetoceros pseudocurvisetus*.

Culture media (ca. 50 – 200 ml)
 |
 Filtration by gentle suction
 (GF/C, 24 mm diameter)
 |
 Grinding within 5 seconds with
 absolute acetone (2 ml) in a mortar
 placed on crushed ice
 |
 Extraction (more than 12 hrs at -20°C)
 |
 Centrifugation ——— Precipitate
 (3000 rpm, 4 min)
 |
 Supernatant
 |
 HPLC analysis (injection volume: 20 µl)
 Stepwise elution
 Merck LiChrosphere (4.6 mm I.D., 150 mm long,
 5µm particle size)
 Detection at 436 nm (Shimadzu UV-140-01)

Stepwise elution program is as follows:

Solvent 1	MeOH:Buffer	80:20, 2 min
Solvent 2	MeOH:Buffer	95: 5, 2 min
Solvent 3	MeOH:Acetone	90:10, 5 min
Solvent 4	MeOH:Acetone	60:40, 15 min

(Buffer: aqueous solution of ammonium acetate, pH = 7.2)

Figure 3.3. Modified HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine diatoms

を C-18カラム (LiChrosphere RP-100-18-5) に注入し, メタノール-酢酸アンモニウム緩衝液 (80:20) 2.0分, メタノール-酢酸アンモニウム緩衝液 (95:5) 2.0分, メタノール-アセトン (90:10) 5.0分, メタノール-アセトン (60:40) 16分の順序で溶出した。溶出速度は 1 ml min^{-1} に設定した。各々の色素のピークの検出は吸光波長 436 nm で行った。

光合成色素の同定は以下の方法で行った。まず, 各々のピークに相当する色素成分を分取して窒素気流下で濃縮乾固した。これらの色素を個別に $5\text{--}10 \mu\text{l}$ のアセトンに溶解し, 超ミクロ石英セルを用いて吸収スペクトルを測定した。この吸収スペクトルと HPLC の保持時間 (標準物質がない試料については溶出順位) により各色素成分を同定した。同定用の色素の吸収スペクトルと溶出順位のデータとして Wright et al. (1991) を用いた。

4) ヌクレオチド分析

分析法の手順は Fig. 3.4 に示した。まず培養珪藻の試料 1000 ml をグラスファイバーフィルター (GF/C) で濾過し, 珪藻を GF/C 上に集めた。濾過終了後, 5 秒以内に氷で冷却した乳鉢に入れた 0.5 M トリクロロ酢酸水溶液に GF/C を浸し, 直ちにすり潰すことによりヌクレオチドを抽出した。抽出時間は 5 分とした。この試料を直ちに遠心分離 (4000 rpm で 2 分間) し, 上澄み液 1 ml に対して四塩化炭素-トリオクチルアミン溶液 (1:4, v/v) 0.9 ml を加え, 冷却しながら緩やかに混合した。再び遠心分離 (4000 rpm で 20 秒間, ローターは手で止める) し, 上層の水相を直ちに HPLC 分析に供した。HPLC 分析は以下の方法で行った: サンプル $20 \mu\text{l}$ を C-18カラム (Inertsil ODS-2, 6 mm ID , 250 mm L) に注入し, リン酸緩衝液による単一相溶出を行った。緩衝液の組成はリン酸 1 ナトリウム 0.140 M , アセトニトリル 10% , テトラブチルアンモニウムヒドロキシド 5 mM である。緩衝液の pH は 2.5 M 水酸化ナトリウム溶液で 6.0 に調整した。HPLC の流速は 0.7 ml min^{-1} とし, 保持時間の安定化とピークのシャープネスの維持のためにカラム温度は 45°C に保持した。各ヌクレオチドの検出は紫外分光光度計 (日本分光, UVIDEC 100-III) で吸収波長 254 nm で行った。

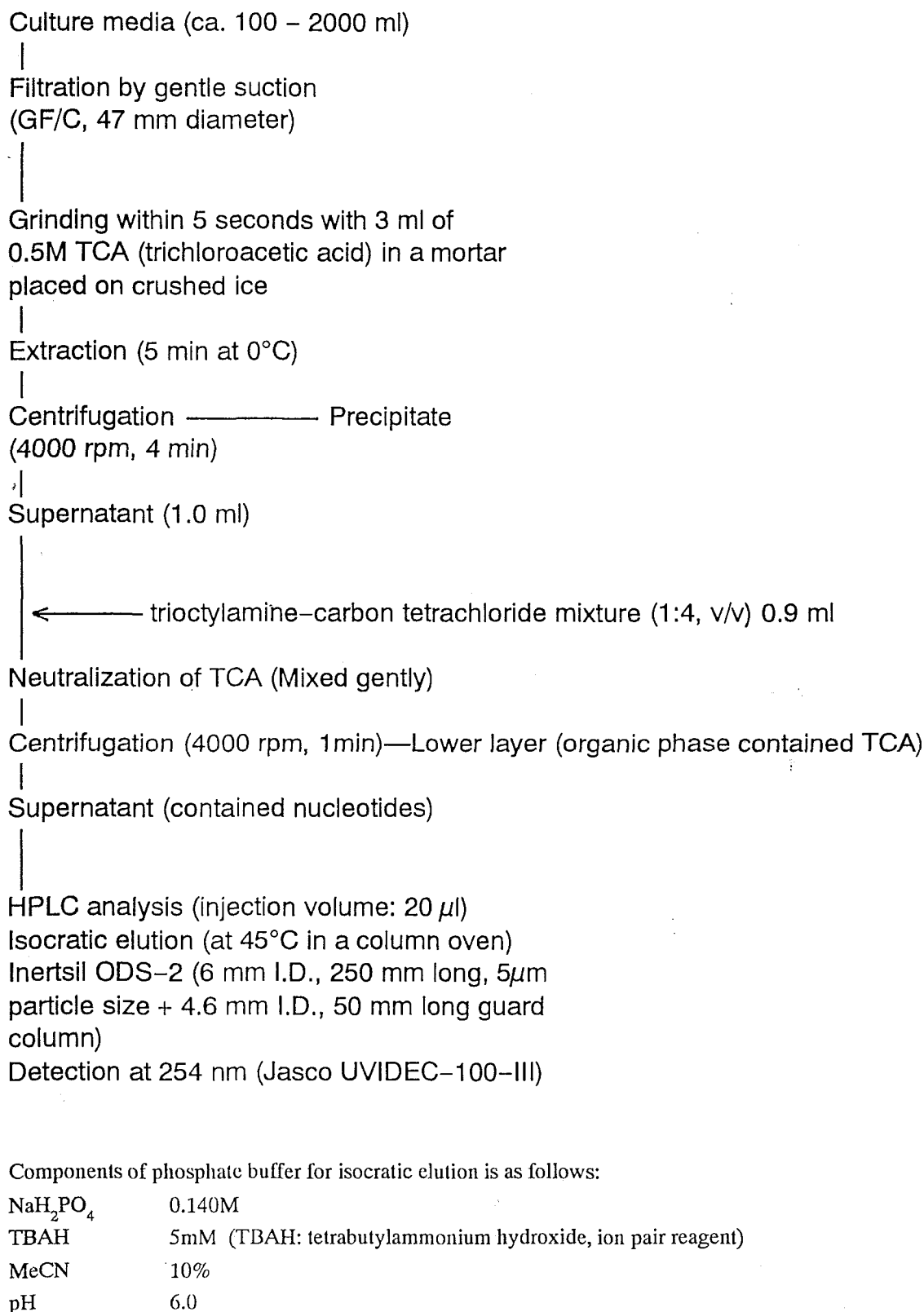


Figure 3.4. Modified method for the determination of nucleotides from marine diatoms

3. 3 結果と考察

3. 3. 1 光合成色素の分析

1) 逆相HPLC法による光合成色素のクロマトグラム

本分析法による *Ch. pseudocurvisetus* の栄養細胞のアセトン抽出物の分析結果（クロマトグラム）と各ピークに相当する色素成分の吸光スペクトルを Fig. 3. 5に示す。珪藻の主要な色素成分である Chl. *a*, Chl. *c*₁ + *c*₂, Fucoxanthin, Diadinoxanthin, Diatoxanthin, β -carotene と、異性体の *cis*-Fucoxanthin, 分解産物と考えられる Phaeophorbide *a* 様物質が全てベースラインから分離されていることがクロマトグラムより明らかである。HPLCによる分離時間は25分以内であり、各ピークのシャープネスもよいことから、本法はこの珪藻の光合成色素の簡便な分離・分析方法として適しているといえる。

しかしながら、ピーク1の Phaeophorbide *a* 様物質の存在（Fig. 3. 5）は、色素抽出時に Chl. *a* の分解が起こっていることを示しており、Chl. *a* の定量値が過小評価される可能性が考えられる。同様の現象は *Skeletonema costatum*（Suzuki and Fujita 1986, Jeffrey and Hallegraeff 1987）、*Chaetoceros**（Jeffrey and Hallegraeff 1987）について知られており、HPLCによる Chl. *a* の分析の困難なことが指摘されている。そこで Phaeophorbide *a* 様物質の生成の抑制方法について検討を加えた。

2) 無傷葉緑体の分離方法の応用

Chl. *a* の分解は主にクロロフィラーゼによる脱フィトール反応と、細胞内酸性物質による脱 Mg 反応が原因と思われる。そこで珪藻細胞をクラス I 葉緑体分離用の分離液により洗浄し、チラコイド膜と液胞の接触反応をできるだけ抑えることを試みた。純アセトンはクロロフィラーゼ活性を抑える働きのあることが知られており（Jeffrey 1974, Riper et al. 1979）、また、予備実験で検討した DMF、メタノール、含水アセトン、メタノール-アセトン混合溶媒、メチルエチルケト

* *Chaetoceros affinis*, *Chaetoceros difficile*, *Chaetoceros* sp.

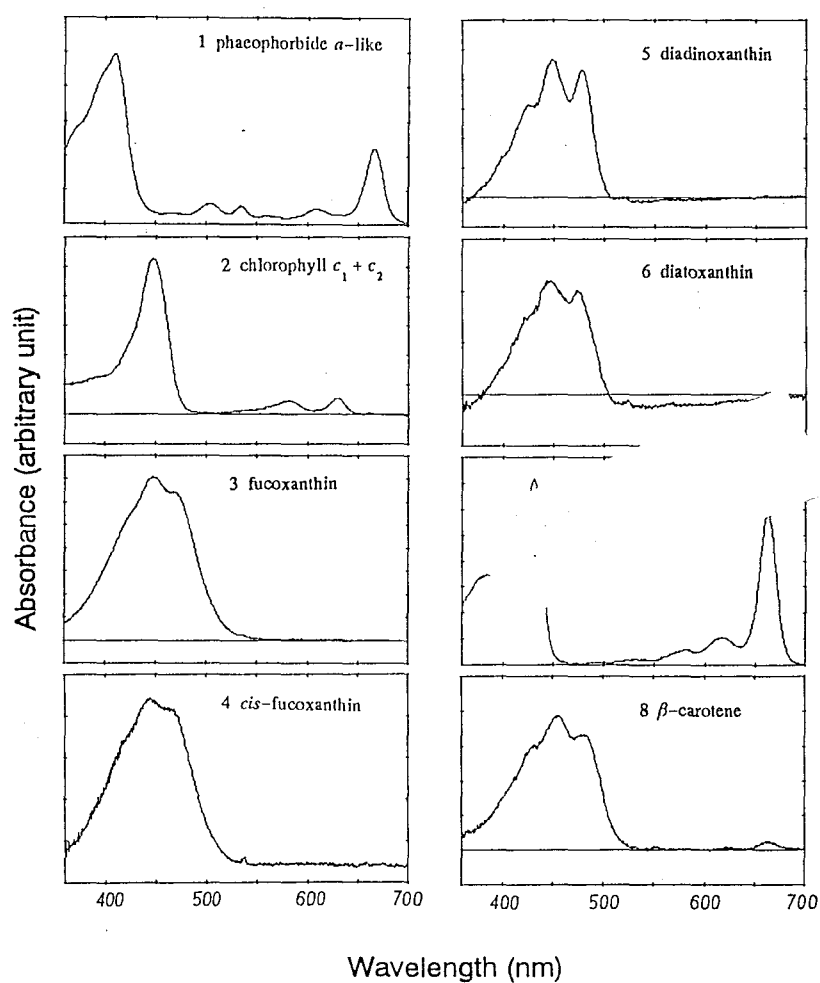
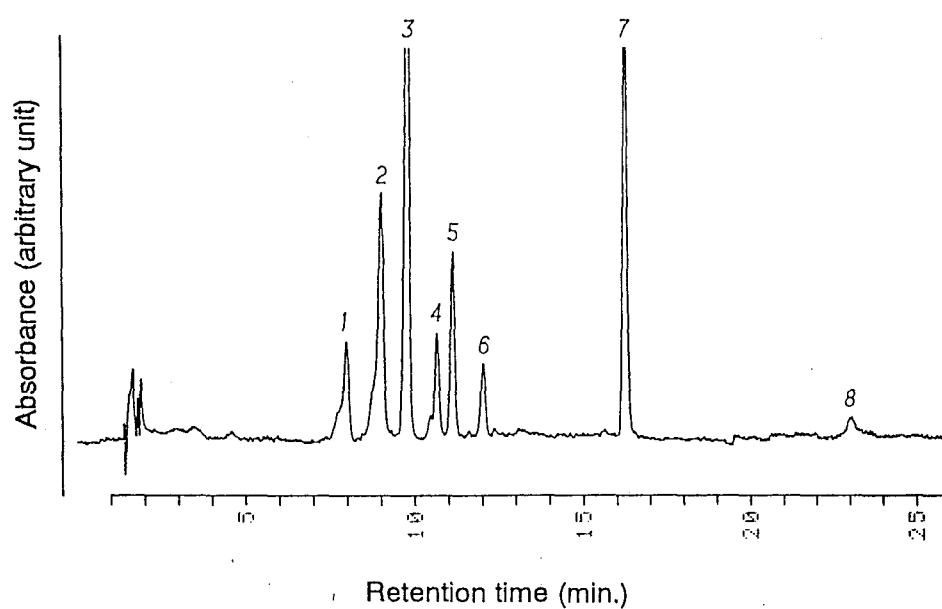


Figure 3. 5. A chromatogram of photosynthetic pigments extracted from *Chaetoceros pseudocurvisetus* and absorption spectra of separated pigments.

Table 3.1. Pigments extraction methods tested for *Chaetoceros pseudocurvisetus*.

Treatment	Air	Cell washing media	Chromatogram
A	PS ¹⁾	seawater	fig 3.6 A
B	NP ²⁾	JB ³⁾	fig 3.6 B
C	PS	JB	fig 3.6 C
D	PS	JB (80°C)	fig 3.6 D
E	NP	NB ⁴⁾	fig 3.6 E
F	PS	seawater	fig 3.7 A
G	PS	JB (pH 7.5)	fig 3.7 B
H	PS	JB (pH 8.0)	fig 3.7 C
I	PS	JB (pH 8.5)	fig 3.7 D

1) passed

2) not passed

3) Jensen-Bassham (1966)

4) Nakatani-Barber (1977)

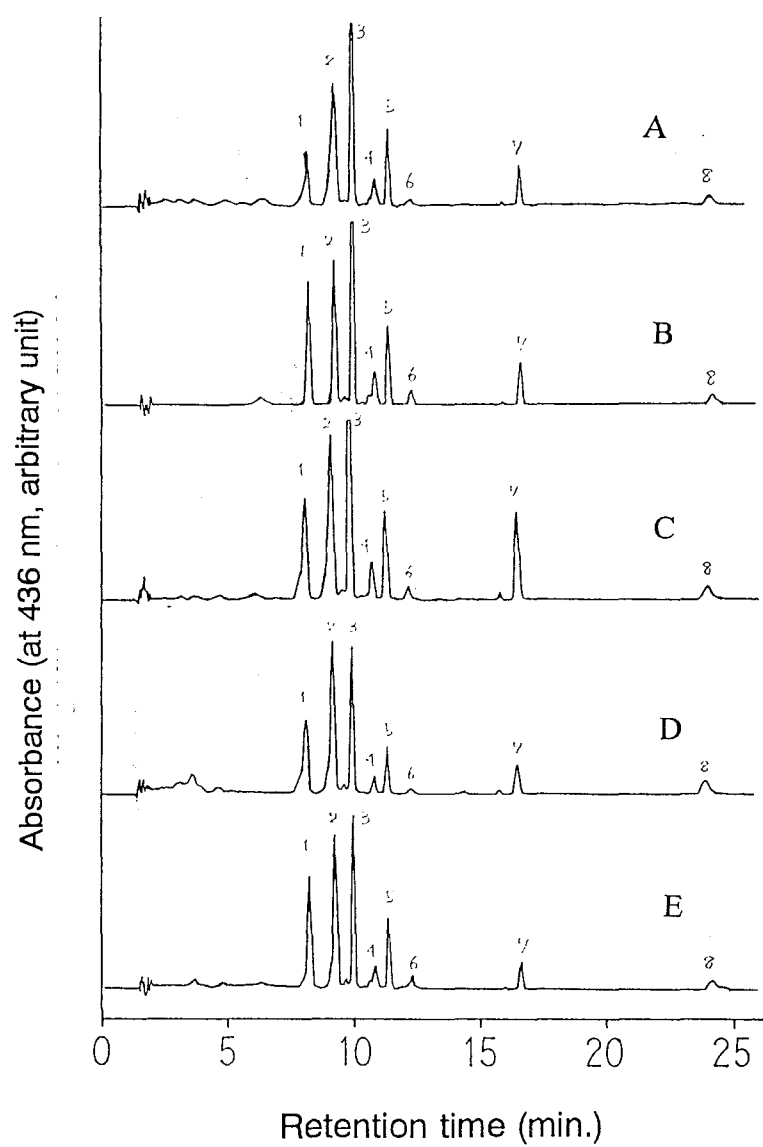


Figure 3. 6. Chromatograms of photosynthetic pigments in various treatments. Treatment methods of sample are described in table 3. 1.

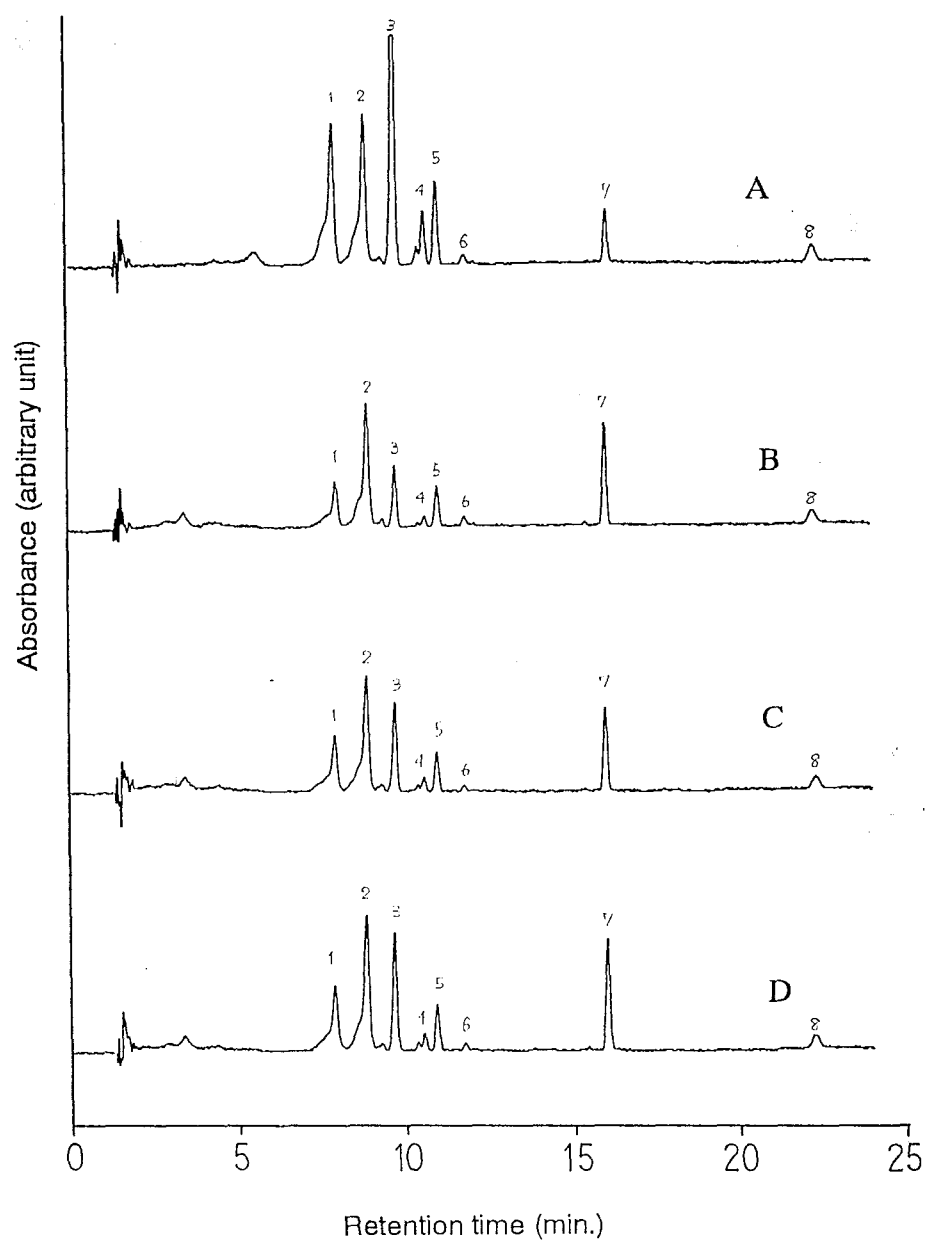


Figure 3. 7. Chromatograms of photosynthetic pigments in various treatments. Treatment methods of sample are described in table 3. 1.

ンと比較しても色素の抽出性・安定性の観点から純アセトンが優れていたもので、抽出溶媒は純アセトンに統一した。

検討した処理方法を Table 3. 1に、得られたクロマトグラムを Fig. 3. 6に示す。Fig. 3. 6B は Jensen-Bassham (1966) の葉緑体分離液で珪藻細胞を保護し、フィルターに空気を通さずに藻体を収穫した場合の分析結果である。HPLC のクロマトグラム上の8分付近に大きな Phaeophorbide *a* 様のピークが確認され、Chl. *a* が分解していることを示している。Phaeophorbide *a* 様物質のピークは同じ葉緑体分離液でフィルターに空気を通させたケースでも見られた (Fig. 3. 6C)。これらの結果から、Jensen-Bassham の葉緑体分離液を用いる方法では、Chl. *a* の分解を抑えることは不可能であることが分かった。

グラス I 葉緑体分離液として知られている Nakatani and Barber (1977) の分離液についても同様の検討を行ったが、やはり Chl. *a* の分解は著しく、色素抽出の前処理として不適当であった (Fig. 3. 6E)。

Phaeophorbide *a* の生成にはクロロフィラーゼの作用が不可欠であると考えられる。したがって、色素抽出時にこの酵素の活性を抑えることができれば Phaeophorbide *a* の生成を最小限にできると思われる。そこで、Jensen-Bassham の分離液を 80° C に加熱し、この溶液をフィルターに注ぎ、濾過する (5秒間) ことにより珪藻細胞内の酵素を熱により失活させることを試みた (Fig. 3. 6D)。この処理でえられたクロマトグラムを見ると、Chl. *a* のピークは小さく、逆に Phaeophorbide *a* 様物質のピークは大きくなっている。溶出時間4分付近に分解生成物と思われる成分不明のピークも生じており、またさらに Fucoxanthin を始めとした Xanthophyll のピークも小さくなっている。したがって熱処理も適当でないことがわかった。

Mg の脱離の防止の観点から、Jensen-Bassham の葉緑体分離液を用い、その pH を 7. 5 から 8. 5 の間で変化させて分析を試みたが、いずれの方法でも Chl. *a* の分解と Phaeophorbide *a* 様物質の生成と Xanthophyll 類のピークの低下が認められた (Fig. 3. 7A-D)。

これらの実験結果から、葉緑体分離液を用いても、*Ch. pseudocurvisetus* 細胞のクロロフィルの分解を抑えることはできないといえる。また、これらの葉緑体分離液が Xanthophyll 色素の分解を引き起こすことを考えると、HPLC 法の前処

理としては葉緑体分離液は使用しない方がよいと考えられる。

以上のように、この珪藻の Chl. *a* は極めて早く分解するので、HPLC による分離定量は困難である。したがって、この珪藻の Chl. *a* は、アセトン抽出物を直接分光光度法 (Jeffrey and Humphrey 1975) で定量して Chl. *a* 関連化合物の合計として測定する方法が適していると考えられる (Jeffrey and Hallegraeff 1987)。そこで本研究では、クロロフィル色素は吸光光度法により定量することとした。

3) 分析精度

各光合成色素の検量線を Fig. 3.8 に示す。Chl. *a*, Chl. $c_1 + c_2$, Fucoxanthin について直線性のよい検量線が得られており、それぞれの回帰直線の相関係数は高い。化学的に Fucoxanthin に類似した構造を持つ Diadinoxanthin と Diatoxanthin についても、検量線には同様の直線性があるものと思われる。

色素の検出は 436 nm の一波長で行っているので、同じ波長で既知の吸光度を持つ試料をインジェクトすれば、得られるピーク面積は常に一義的に決まる。そこで、オオバモクから分離精製した Fucoxanthin と Chl. $c_1 + c_2$ をアセトンに溶かし、吸光度を測定した後に HPLC で分析し、吸光度とピーク面積の関係 (レスポンスファクター) を求めた (Fig. 3.8)。いずれの点も回帰直線から外れることなく、良好な直線性を保っている。したがって、この直線関係を用いればいずれの光合成色素も、ピーク面積から吸光度に換算でき、既知の吸光係数を用いて定量することができる。

培養珪藻を試料とした場合の繰り返し再現性を Table 3.2 に示す。各光合成色素のピークの保持時間の再現性は良く、また、ピーク面積再現性も Xanthophyll については 4% 以下であり定量精度はよいといえる。クロロフィル類のピーク面積再現性は Xanthophyll 類に比べてよくないが、これは試料に混在するクロロフィラーゼによる分解の影響を受けたものと思われる。

以上の結果から、*Ch. pseudocurvisetus* の光合成色素の HPLC 分析法が確立されたものと判断した。

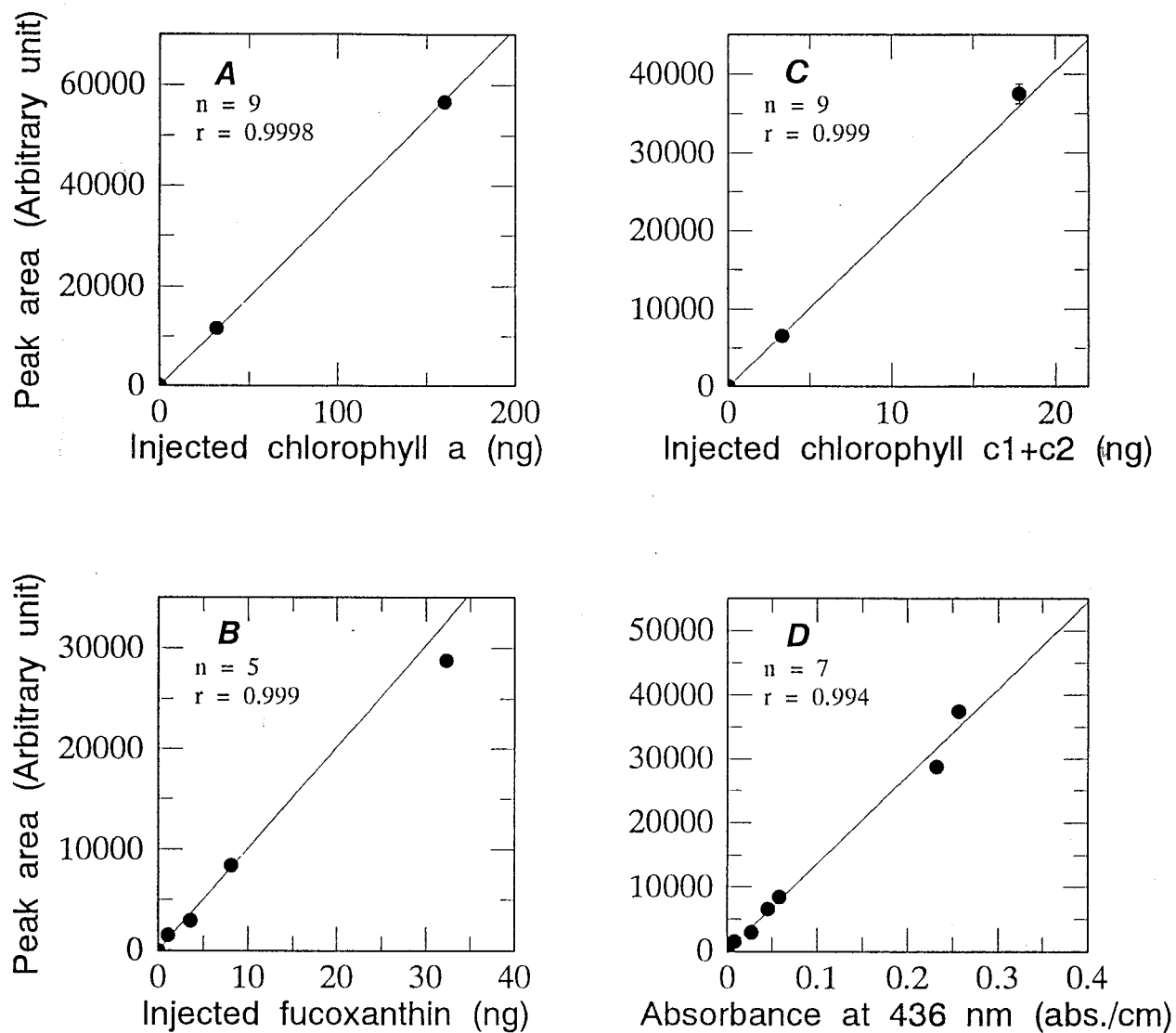


Figure 3. 8. Relationship between injected amounts of pigments and peak area in chromatograms. (A) chlorophyll *a*; (B) fucoxanthin; (C) chlorophyll *c*₁+*c*₂; (D) response factor.

Table 3.2. Reproducibility of determination of chlorophyllous and xanthophyll pigments. Pigments were extracted from cultured *Chaetoceros pseudocurvisetus* with absolute acetone, separated by HPLC, and peak areas in chromatograms were measured (n=3).

Pigment	Retention time (mean \pm s.d.)	Relative standard error of peak area (%)
fucoxanthin	9.70 \pm 0.02	1.1
diadinoxanthin	10.85 \pm 0.02	2.6
diatoxanthin	11.65 \pm 0.06	3.7
chlorophyll a	15.92 \pm 0.02	6.0
chlorophyll c	8.78 \pm 0.04	28

3. 3. 2 珪藻細胞中のヌクレオチドの分析

1) 溶出溶媒の検討

UV 吸収を用いて検出できるヌクレオチドのうち、植物の代謝成分として重要な AMP, ADP, ATP, ADPG, NADP⁺, UDP, UTP, UDPG の分離定量をめざした (NADPH は Fig. 3. 11 に示したように TCA 抽出時に分解するので、重要な代謝物質ではあるが除外した)。

まず上記のヌクレオチド混合物 (インジェクト量 40 pmol) を標準試料として溶出溶媒を検討し、最も分離に適している溶媒組成を探した。逆相クロマト法によるヌクレオチドの分析においては、メタノール-リン酸緩衝液-テトラブチルアンモニウム系イオンペア剤の組み合わせが広く用いられている (例えば Moal et al. 1989, Walker et al. 1986)。そこでカラム Inertsil ODS-2 に対する溶媒としてメタノール-リン酸緩衝液-テトラブチルアンモニウムヒドロキシドの組み合わせで標準試料の分離を試みた。

この溶媒系における最適分離クロマトグラムを Fig. 3. 9(A) に示す。クロマトグラムからわかるように、このメタノール系溶媒では AMP, NADP⁺, UDP が同時に溶離しており、全く分離できていない。ADP, ADPG, UTP についても分離は不完全である。このようなヌクレオチドの同時溶出は、メタノールとリン酸緩衝液をどのような比率で組み合わせても起こり、また、pH のコントロールによっても標準物質のベースライン分離はできなかった。

そこで溶離液をメタノール系からアセトニトリル-リン酸緩衝液-テトラブチルアンモニウムヒドロキシドの組成に切り替え、分離条件を検討したところ、アセトニトリル 10%, テトラブチルアンモニウムヒドロキシド 5 mM, リン酸一ナトリウム 140 mM の組成を持つ溶媒を水酸化ナトリウム (2.5M) で pH = 6.0 に調整した溶離液が最も分析に適していることが分かった。この溶離液を用いたクロマトグラムを Fig. 3. 9(B) に示す。標準試料 8 種は全てベースラインから分離されており、かつピークのシャープネスも良く、分析時間もインジェクト時から 30 分以内に収まっている。以後はこの溶媒組成を用いて実験した。

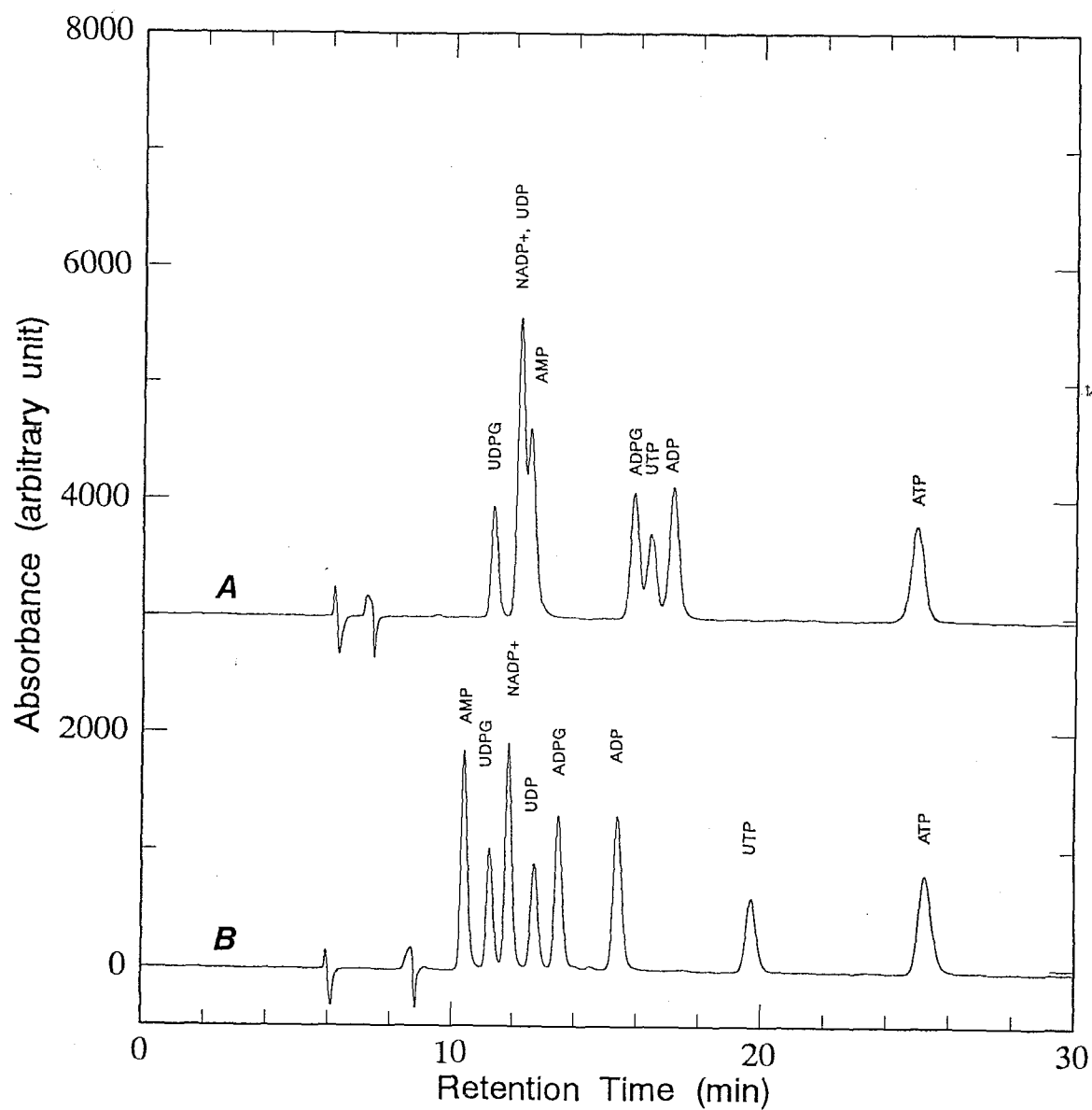
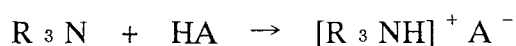


Figure 3. 9. Chromatograms of eight-component standard mixture by ion-pair reverse-phase HPLC under different separation conditions. (A) MeOH-phosphate buffer; (B) MeCN-phosphate buffer.

2) トリクロロ酢酸 (TCA) 抽出物の中和法の検討

トリクロロ酢酸 (TCA) は生物体からのヌクレオチドの抽出に広く用いられている。しかし、この酸抽出物はそのまま HPLC に導入することはできない。抽出物中の TCA が HPLC カラムの劣化を早め、また、試料の pH 条件の変化が溶出成分の保持時間の変化を引き起こすからである。したがって TCA 抽出物は HPLC へ導入する前に中和する必要がある。TCA の中和は強アルカリで行われているが、操作の煩雑さに加えて、中和過程での試料の希釈、ヌクレオチドの分解が生じることが知られている (Moal et al. 1989)。そこで本研究では強アルカリを用いない、第三アミンによる中和法について検討した。この方法は過去に Khym (1975) により試みられており、ここではそれを応用した。この中和方法の操作手順は、TCA 抽出物に有機溶媒に溶解した第三アミンを計算量加えて振り混ぜるだけであり、極めて簡便である。中和反応式は以下のように表される。



この反応で生じる塩の分配性を利用して、アミンと酸から生じた塩を有機相に抽出し、ヌクレオチドを水相に残すことができれば試料の希釈を伴わずに TCA の中和を行うことができる。Khym (1975) は有機相にフロン113 を用い、第三アミンは水への溶解度が極めて低いトリオクチルアミンを用いて TCA の中和に成功している。しかし現在では、フロン113 は特定フロンに分類されており、環境に与える影響が好ましくないために、生産・使用ともに中止の方向に向かっている。そこで、第三アミンはトリオクチルアミンとし、抽出溶媒としてフロン113の代わりにジクロロメタンと四塩化炭素が使用可能かどうかを検討した。

検討結果を Fig. 3. 10に示す。ジクロロメタンでは ADP と ATP の有機相への分配が起こっており、回収率はそれぞれ36.2, 0.0%であった。一方、抽出溶媒に四塩化炭素を用いた場合はいずれのヌクレオチドの回収率も96%以上であった。したがって、トリオクチルアミン-四塩化炭素溶液を用れば、簡便でしかも試料の希釈を伴わない TCA の中和ができることがわかった。

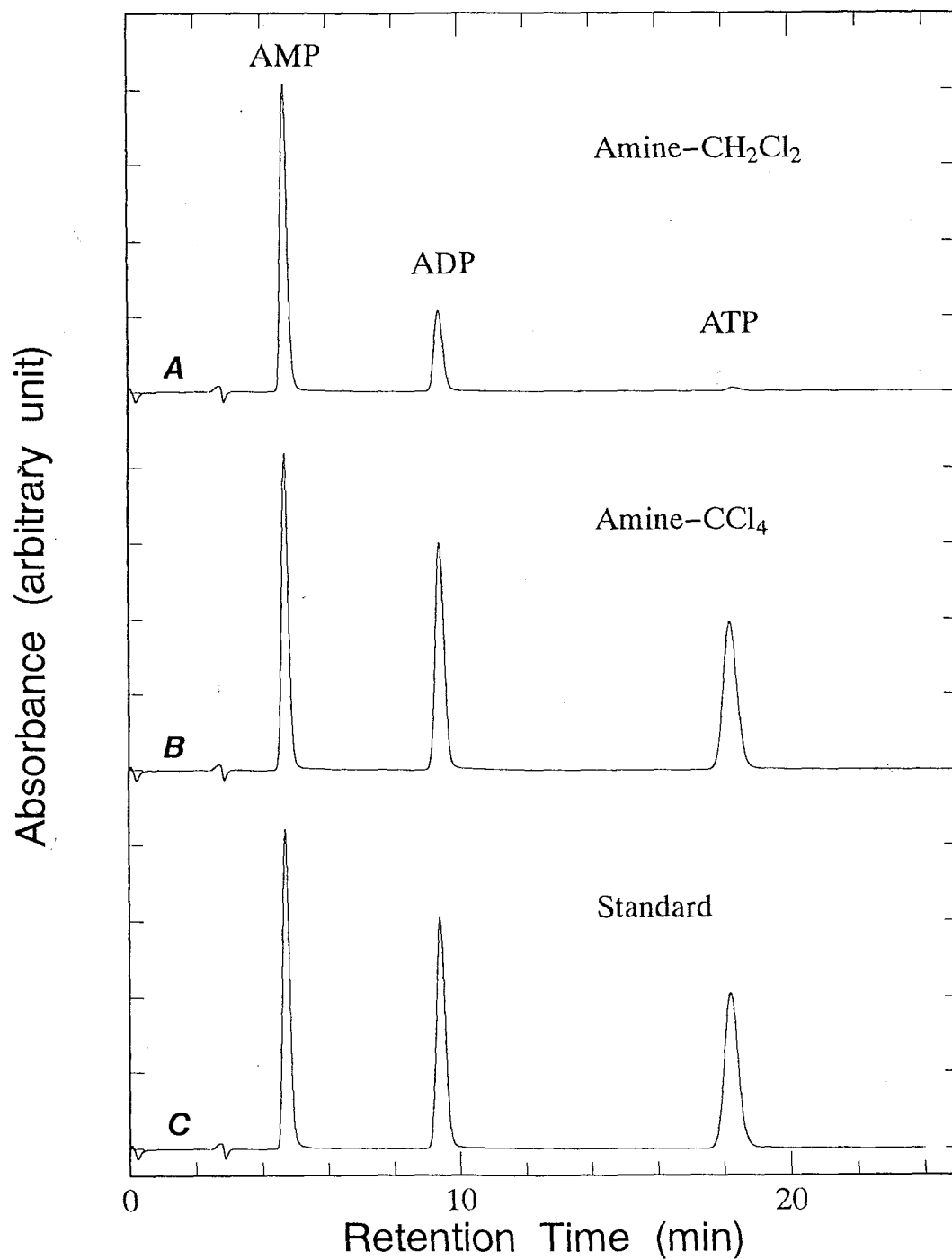


Figure 3. 10. Recovery ratio of adenine nucleotides in neutralized treatment using two kinds of organic solvent. (A) Dichloromethane, (B) carbon tetrachloride, (C) mixed standard.

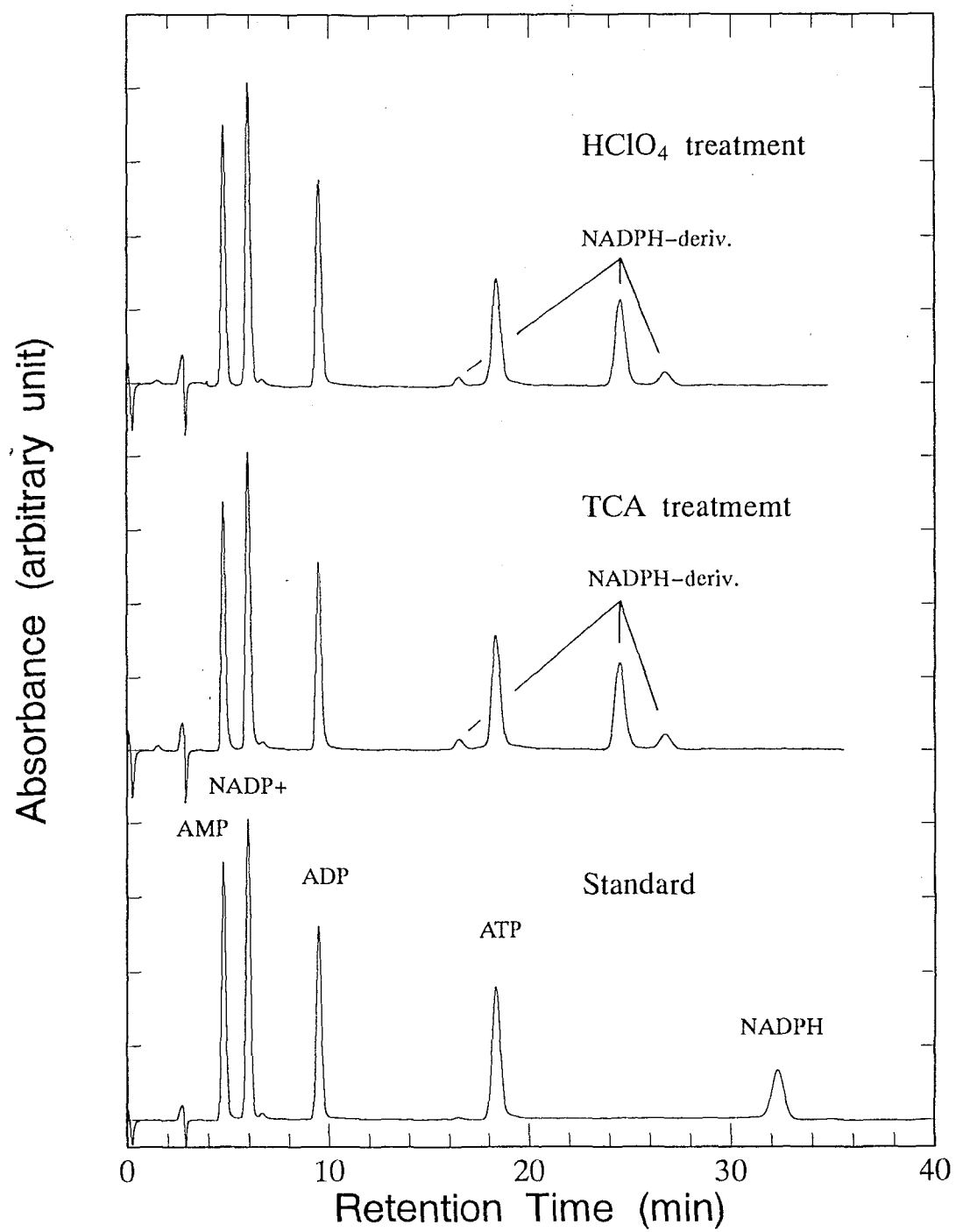


Figure 3. 11. Decomposition of NADPH by strong acid extraction.

3) 分析精度および試料の分析

以上の検討結果から、TCA 抽出、トリオクチルアミン-四塩化炭素中和、アセトニトリル-リン酸緩衝液-テトラブチルアンモニウムヒドロキシド系溶媒による分析方法を最終的なものとした (Fig. 3.4)。この方法は単一相溶出のため、分析の再現性は非常に良く、どの標準試料においても保持時間の標準偏差は 0.02 分以内であった (Table 3.3)。これらのヌクレオチドの検量線を Fig. 3.12 に示したが、32 pmol から 800 pmol の範囲においていずれの成分も非常によい直線性を持っている。ピーク面積の繰り返し再現性は 40 pmol レベルで 4 % 以内程度であり、高い再現性を持っている (Table 3.3)。検出限界はベースラインの安定性に依存するが、アデニンヌクレオチド類 (AMP, ADP, ATP) でおよそ 2 ~ 6 pmol 程度であった。

珪藻試料と標準物質のクロマトグラムを Fig. 3.13 に示してある。珪藻試料中の ADP, ADPG, ATP, UDP, UTP のベースライン分離が確認できる。一方, UDPG, NADP⁺ は複数のピークに埋もれていた。UDPG についてはそのピークの形状から、あるバイアス値を持つものの定量は可能であるが、NADP⁺ は未同定物質とピークがほぼ重なっており、分離同定は困難であった。

以上の結果から、十分な感度と精度を持ち、しかも簡便な珪藻試料中のヌクレオチドの HPLC 分析法が確立されたと判断した。

Table 3.3. Reproducibility of determination of (di)nucleotides. Nucleotides were injected as mixed solution. Injected amount of each nucleotide was 40 pmol (n = 5).

Nucleotides	Retention time (mean \pm s.d.)	Relative standard error of peak area (%)
AMP	10.40 \pm 0.00	0.54
UDPG	11.24 \pm 0.00	0.82
NADP ⁺	11.86 \pm 0.01	0.85
UDP	12.71 \pm 0.00	1.83
ADPG	13.50 \pm 0.01	2.27
ADP	15.40 \pm 0.00	2.32
UTP	19.72 \pm 0.01	3.78
ATP	25.27 \pm 0.02	2.97

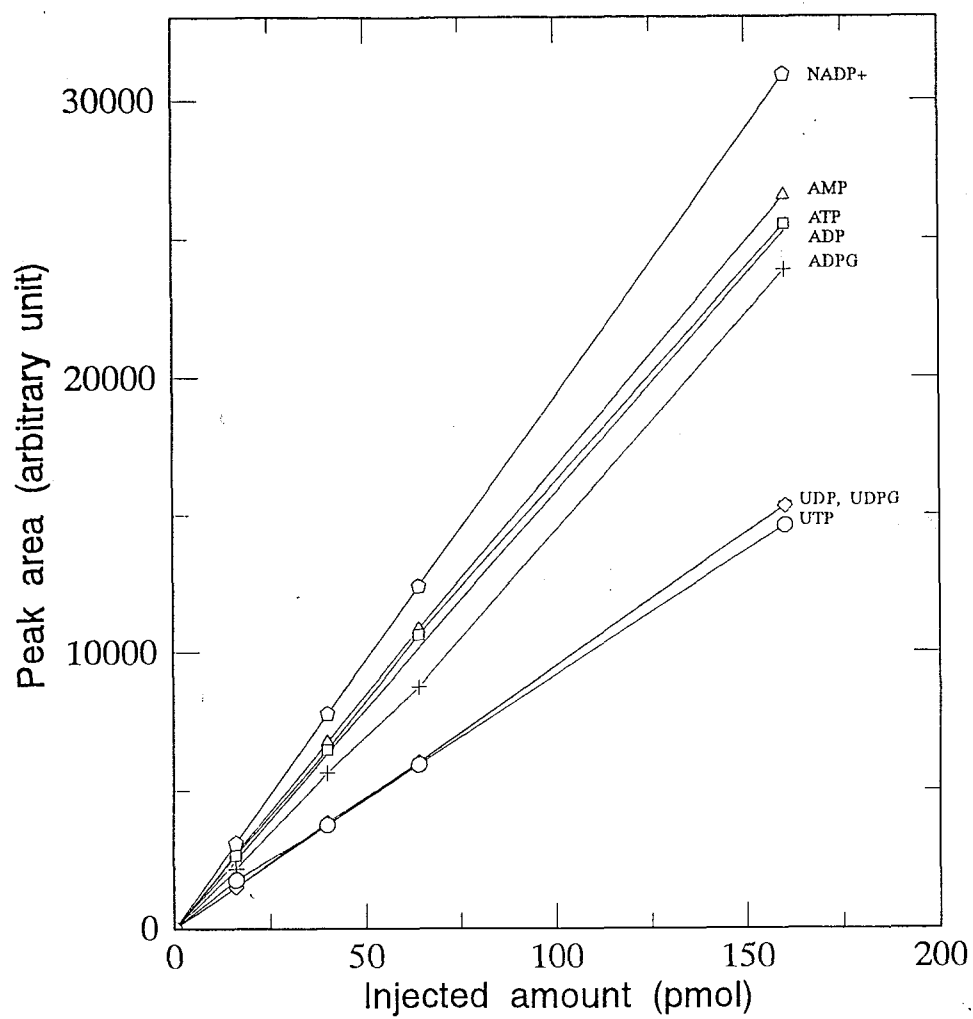


Figure 3. 12. Calibration curves of eight kinds of nucleotides by HPLC. Procedure of analysis is described in Fig. 3. 4.

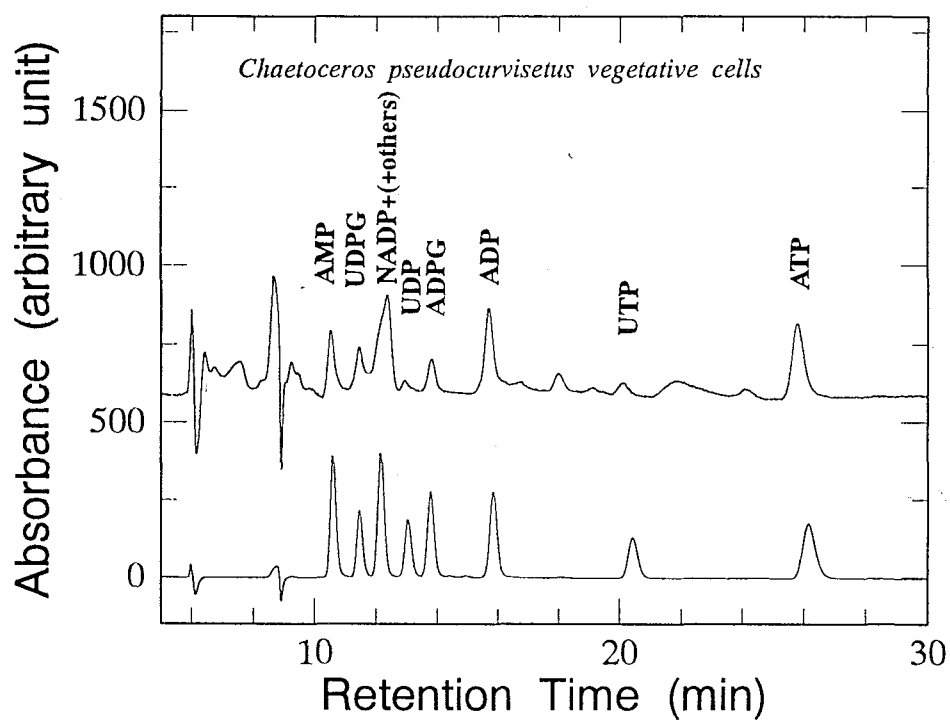


Figure 3. 13. Chromatograms of nucleotides extracted from *Chaetoceros pseudocurvisetus* vegetative cells and standard mixture.

3. 4 まとめ

珪藻 *Ch. pseudocurvisetus* を試料として、光合成色素とヌクレオチドの分析法の確立を試みたところ、以下の結果を得た。

光合成色素分析法の検討

- 1) 単純なステップワイズ溶出で珪藻の主要光合成色素8種の分離が達成された。
- 2) 通常の色素抽出法では、HPLC 法による Chl. *a* の定量分析は困難である。
- 3) Xanthophyll についてはアセトン抽出－HPLC 分析で定量可能である。
- 4) Chl. *a* の定量については、アセトン抽出－吸光光度法が現実的と思われる。

ヌクレオチド分析法の検討

- 1) TCA 抽出－第三アミン中和法が前処理として適していた。
- 2) イオンペア－逆相クロマトグラフ法において、最適な溶媒を検討したところ、単一相溶出により、極性が近接した8種のヌクレオチドのベースライン分離が可能になった。

第4章 休眠孢子形成に伴う細胞内リン組成の変化

4. 1 はじめに

リン酸は生命活動にとってきわめて重要な化合物の一つである。環境水中のリン酸は植物プランクトンに積極的に取り込まれ、高濃度に濃縮される。即ち、海洋におけるリン酸濃度は通常は $1\ \mu\text{M}$ 以下であるが、植物プランクトン細胞内のリン酸濃度は数 10mM にも達する (Miyata et al. 1986)。

植物プランクトンに取り込まれたリン酸は核酸、糖リン酸、ヌクレオチド、リントタンパク、リン脂質などのさまざまなリン酸化合物に変換され、タンパク合成、遺伝、光合成、窒素固定などの無数の生命過程の様々な局面において極めて重要な役割を果たしている。これらのリン酸化合物の細胞内濃度は細胞の生理状態によって様々に変化することが知られており (Sawada et al. 1989, Sawada 1990, 臼田 1995), とりわけ細胞の休眠の解除とリン酸化合物の代謝は密接に関係していることが指摘されている (Hall and Hodges 1966, Mukherji et al. 1971, 藤伊 1975)。例えば、陸上植物を用いた研究によれば、休眠の解除によって細胞内の貯蔵リン酸 (フィチン) の濃度が低下してゆく一方で、可溶性リン酸とオルトリン酸の濃度が上昇してゆく現象が観察されている (Hall and Hodges 1966)。このようなことから、増殖が抑制されている細胞とみなされている休眠孢子と、活発に増殖している栄養細胞との間では、細胞内リン化合物の組成に違いのあることが予想されるので、この差異を詳しく調べることによって細胞内リン代謝の観点から休眠孢子の生理的特性が明らかにされるものと期待される。

そこで本章では窒素制限、リン制限、栄養制限なしの条件下で珪藻を培養し、対数増殖期と定常期、あるいは休眠孢子優占期に細胞内リン化合物を分画法により測定し、休眠孢子形成過程とそれに伴うリン組成の変化について調べることにした。これら一連の実験の結果から孢子形成に伴う細胞内リン代謝の変化について考察した。

4. 2 材料と方法

1) 培養実験方法

実験手順を Fig. 4. 1に示す。培養には5.5lのポリカーボネート製ボトルを用いた。培養系はそれぞれの栄養条件につき2本用意した。様々な栄養条件下における休眠孢子中のリン組成を測定するために、栄養塩類の初期濃度と比率*は以下のように設定した(単位 μM)。

- 1) 窒素制限培養系 $\text{N:P:Si} = 12:10:170$
- 2) リン制限培養系 $\text{N:P:Si} = 120:2:170$
- 3) 栄養過剰培養系 $\text{N:P:Si} = 120:10:170$

金属混合液とビタミン類の組成・濃度は $f/2$ に相当する量とした (Guillard and Ryther 1962)。培養温度は $21 \pm 1^\circ\text{C}$ とし、明暗周期は $14\text{L} : 10\text{D}$ とした。光強度は白色蛍光灯により $150\text{--}200 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ に調節した。光量子は LI-Cor Model LI-185 光量子計に $400\text{--}700 \text{ nm}$ 無指向性センサーを装着して測定した。

Ch. pseudocurvisetus の前培養は 700 ml の $f/10$ 培養液 ($f/2$ の5倍希釈培養液)を入れた 1l のポリカーボネートの三角フラスコを用いて行った。この前培養の対数増殖期の細胞を初期細胞濃度が $530 \text{ cells ml}^{-1}$ になるように各栄養条件の培養系に接種した。維持培養中にはバクテリアは確認されなかったが、培養実験は開放系で操作したので各培養系は無菌にはなっていないものと思われる。

珪藻と栄養塩濃度を均一にするために、培養ボトルは試料採取の前に緩やかに振とうした。細胞計数と栄養塩測定のための試料は 24 ± 0.5 時間の間隔で採取した。リン組成分析のための試料は接種後3, 6, 10日後に採取した。細胞計数用の試料はすべてグルタルアルデヒドで最終濃度が 2.5% になるように加えて固定し、Sedgwick-Rafter チャンバーを用いて倒立顕微鏡で計数した。誤差を 10% 以内に維持するために最小でも200, 通常は500から1000の細胞を計数した (Lund et al. 1958)。比増殖速度・休眠孢子形成速度は、増殖曲線の対数増殖期の直線部分

* 本論文では珪藻試料採取時までに栄養塩類が枯渇しないような培養系を、栄養過剰培養系と定義する。この培養系の栄養塩濃度は、春期相模湾表層水の $10\sim 20$ 倍の濃度にあたる。

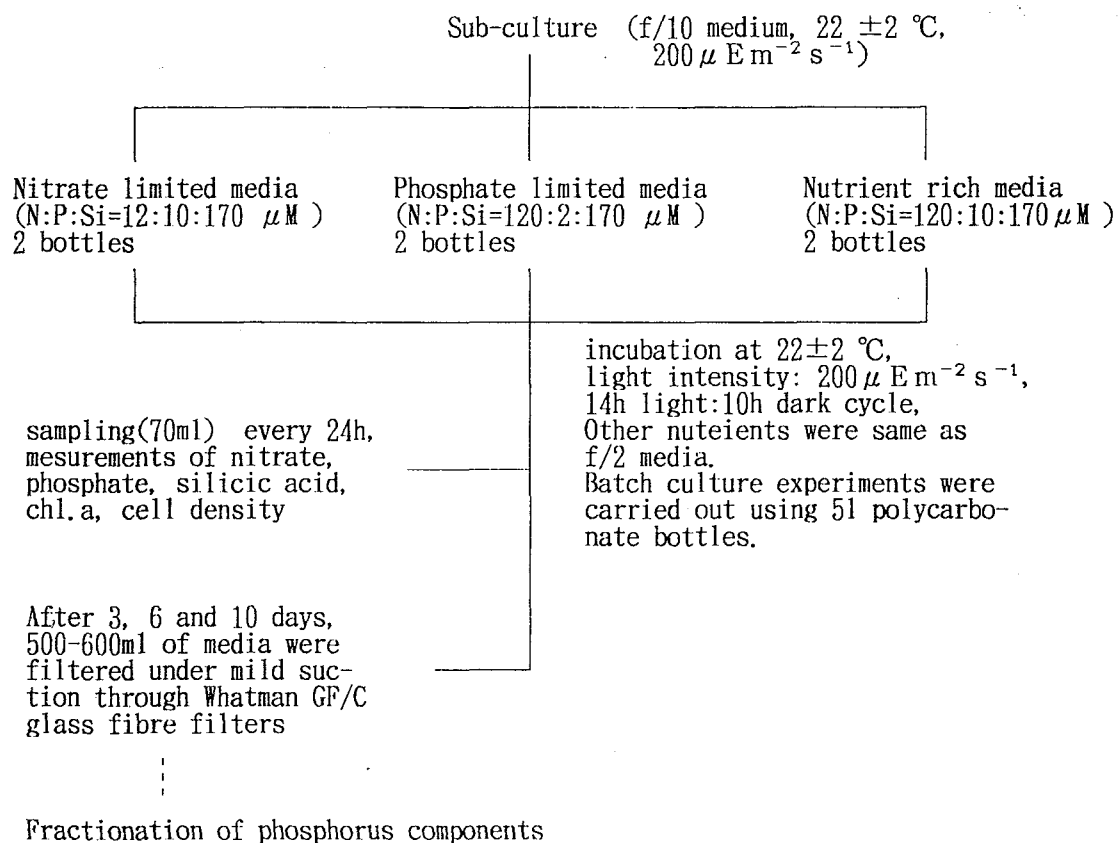


Figure 4. 1. Procedure of the culture experiments under various nutrient conditions.

の栄養細胞数または休眠孢子数と時間（増殖期間）から計算*した。

窒素・リン・ケイ素の細胞含量は栄養塩類の消費量と細胞数の増加から見積もった。この見積もり値は、各元素の一部が細胞から排出される場合には過大評価となる。しかし、溶存有機窒素のような細胞外栄養物質の排出は3種の大型海産珪藻のバッチ培養実験において無視できることが知られており（Goldman et al. 1992），また、予備実験で *Chaetoceros pseudocurvisetus* の細胞外への有機窒素・リンの排出が様々な栄養条件下のバッチ培養において無視できる量であることも確認したので（培養期間10日未満），栄養消費と細胞数から見積もられる細胞含量は細胞内の栄養蓄積量と等しいとみなした。

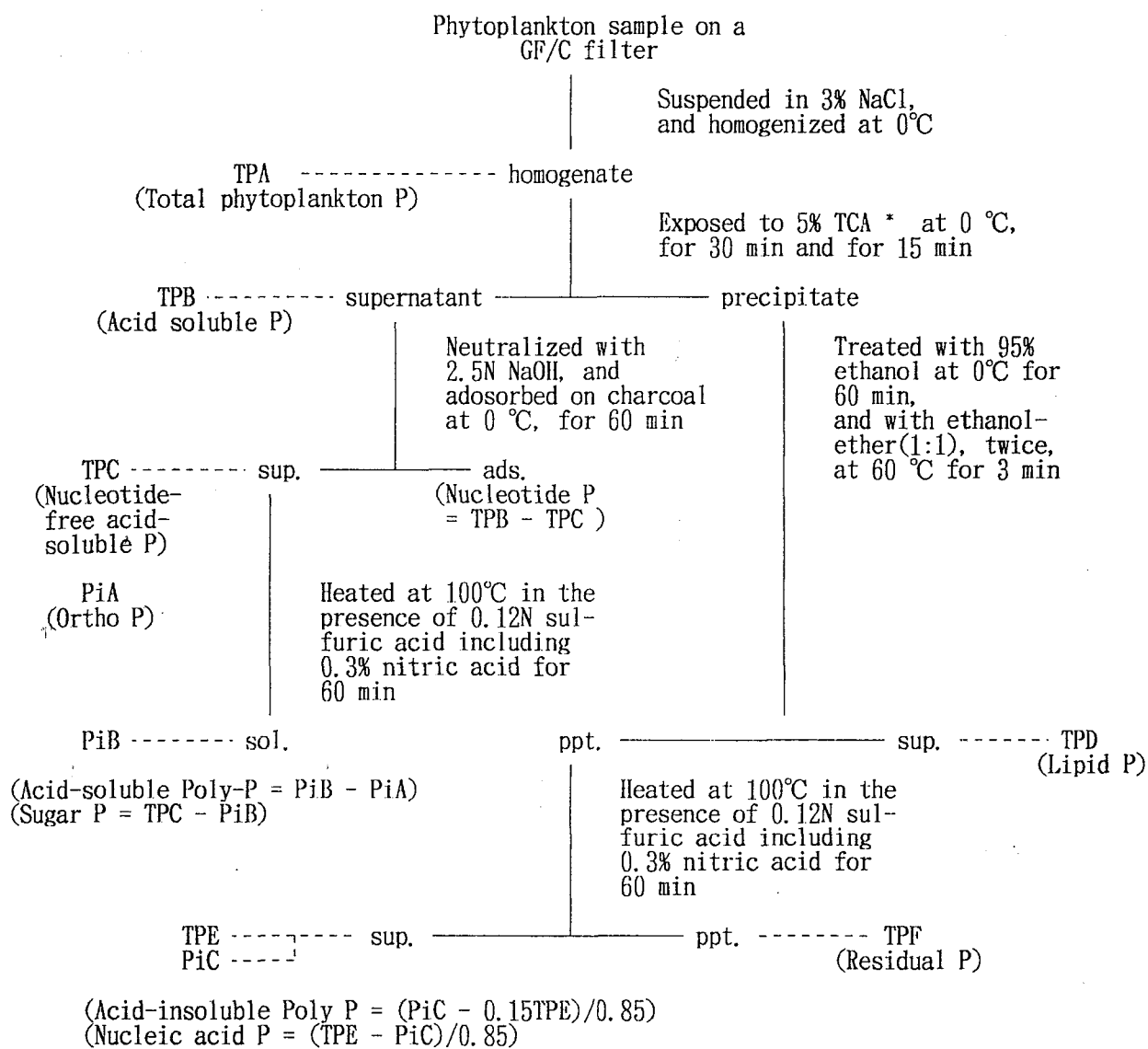
2)測定項目及び分析法

培養液の一部をグラスファイバーフィルター（Whatman GF/C）で穏やかに吸引濾過し、濾液を溶存態硝酸塩と反応性リン酸の測定に用いた。濾過過程でのフィルターからの珪酸の溶出を避けるために、珪酸測定用の試料はセルロースフィルター（Advantec No. 6）を用いて濾過した。濾液中の硝酸塩は Strickland and Parsons (1968)，リン酸は Murphy and Riley (1962) を Koroleff (1983) が改変したモリブデンブルー法，珪酸は Sugawara (1969) のモリブデンイエロー法で測定した。GF/C 上に集められた珪藻試料はクロロフィル濃度とリン化合物組成の分析に用いた。

代謝物質の組成や含量は光条件の影響を受けて変化することが考えられるので、リン組成分析用の試料はすべて光照射9-10時間の範囲内で収穫した。GF/C 上に集められた全ての珪藻試料は直ちに凍結し、分析時まで -35°C で保存した。Chl. *a* は吸光光度法（Strickland and Parsons 1972）により分析した。細胞内リンは Miyata and Hattori (1986) により報告されている連続抽出法により、オルトリン酸，核酸，ヌクレオチドリン，糖リン酸，酸可溶性ポリリン酸，脂質リン，酸不溶性ポリリン酸，タンパク様リンの8つに分画した（Fig. 4.2）。

* $\mu (\text{day}^{-1}) = (\ln N_{t+1} - \ln N_t)$

但し、 N_t は t 日目における細胞密度



* TCA : trichloroacetic acid

Figure 4. 2. A flow sheet of fractionation of cultures diatom phosphorus. TP's and Pi's are total phosphorus and orthophosphate in the indicated fractions respectively. (after Miyata and Hattori 1986)

各フラクション中の全リンの測定は Menzel and Corwin (1965) の方法をわずかに改変して測定した。即ち、2.5 ml の3.0% 過硫酸カリウム溶液と5.0 ml の試料溶液の混合物を120° Cで60分間のオートクレーブ処理を施し、得られたオルトリン酸を上述の方法で測定した。全ての結果は2回の実験の平均値として表示した。

4. 3 結果と考察

1) 栄養増殖と休眠孢子形成

各培養系の増殖の様子は対数増殖期と定常期の2つの相に分けられる (Fig. 4. 3)。栄養過剰の条件では、珪藻細胞は培養4日目頃まで対数的に増え、培養10日目には 5.4×10^4 cells ml⁻¹に達した。この栄養条件では実験期間を通して終始栄養細胞が優占していたが、休眠孢子も対数増殖期の終わりにから増え始め、実験終了時には全細胞数の34%になっていた。このことは、栄養過剰培養系にも休眠孢子形成を誘導する因子が存在することを示している。細胞の過剰な増加により、微量栄養素が枯渇したことが孢子形成の誘導因子となっている可能性も考えられるが、詳細は不明である。

窒素制限培養系では全細胞数は対数増殖期の終わりに 3.3×10^4 cells ml⁻¹に達し、培養の終わりまでそのレベルを保っていた。しかし、栄養細胞数は最大細胞数に到達した後に速やかに減少しはじめ、培養終期には 5.7×10^3 cells ml⁻¹にまで低下していた。これとは対照的に、休眠孢子的形成は対数増殖期中頃から活発に始まり、実験終了時には全細胞数の79%に達した。

リン制限培養系の全細胞数は対数増殖期の終わりに最大に達し (4.6×10^4 cells ml⁻¹)、この状態は実験終了時まで維持されていた。窒素制限培養系と同様に栄養細胞は対数増殖期以後に減少したが、休眠孢子数は増加し、培養終期には全細胞数の65%を占めていた。この結果からみれば、リン欠乏も休眠孢子形成の誘導因子として働くことが明らかである。

対数増殖期初期の比増殖速度は栄養過剰条件で 1.2 d^{-1} 、窒素制限・リン制限条件の両方で 1.4 d^{-1} であり、栄養条件の違いによる増殖速度の違いは認められ

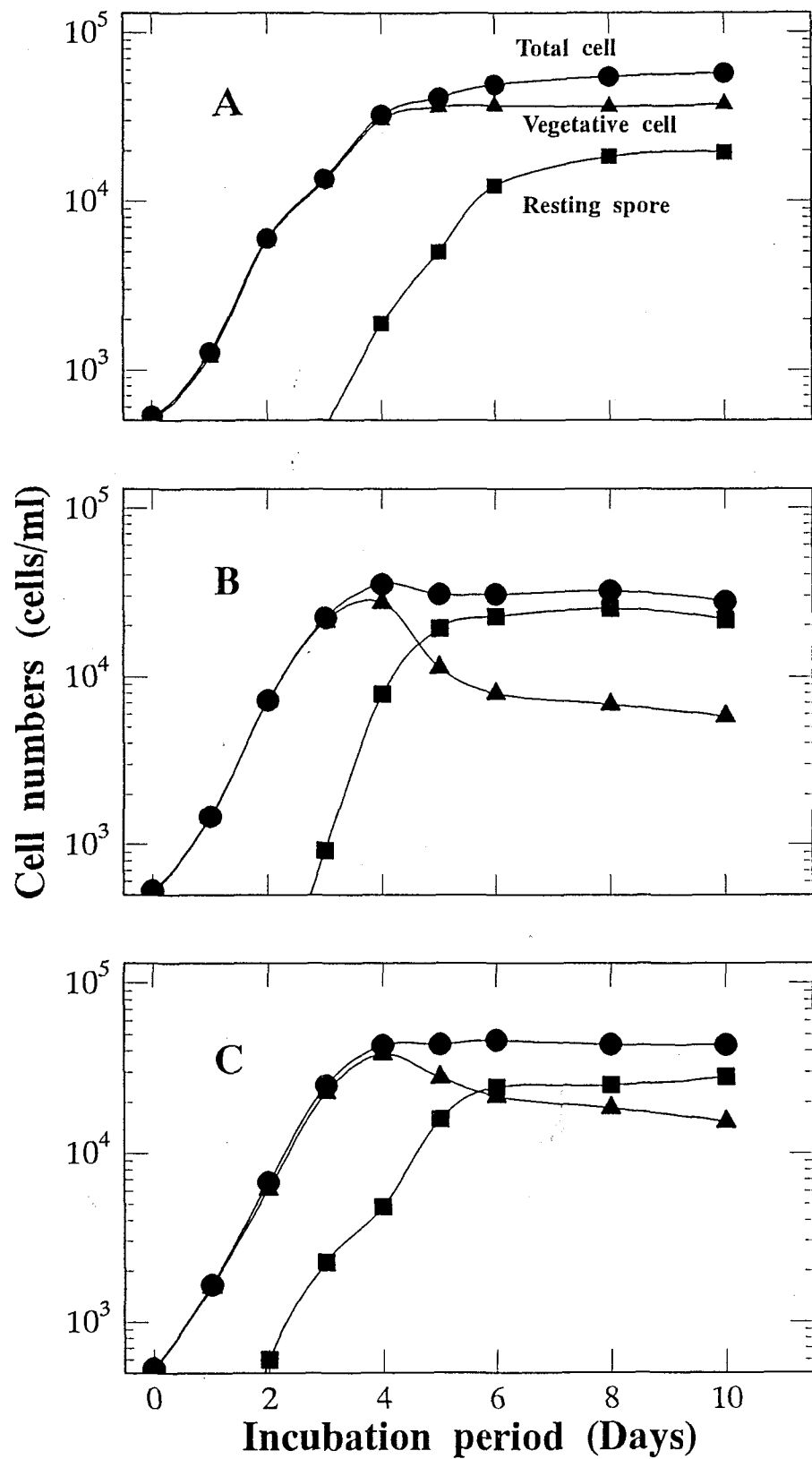


Figure 4. 3 Temporal changes in densities of total cells (circle), vegetative cells (triangle), and resting spores (square) in batch culture experiments under various nutrient conditions. (A) nutrient replete; (B) nitrogen limitation; (C) phosphorus limitation conditions.

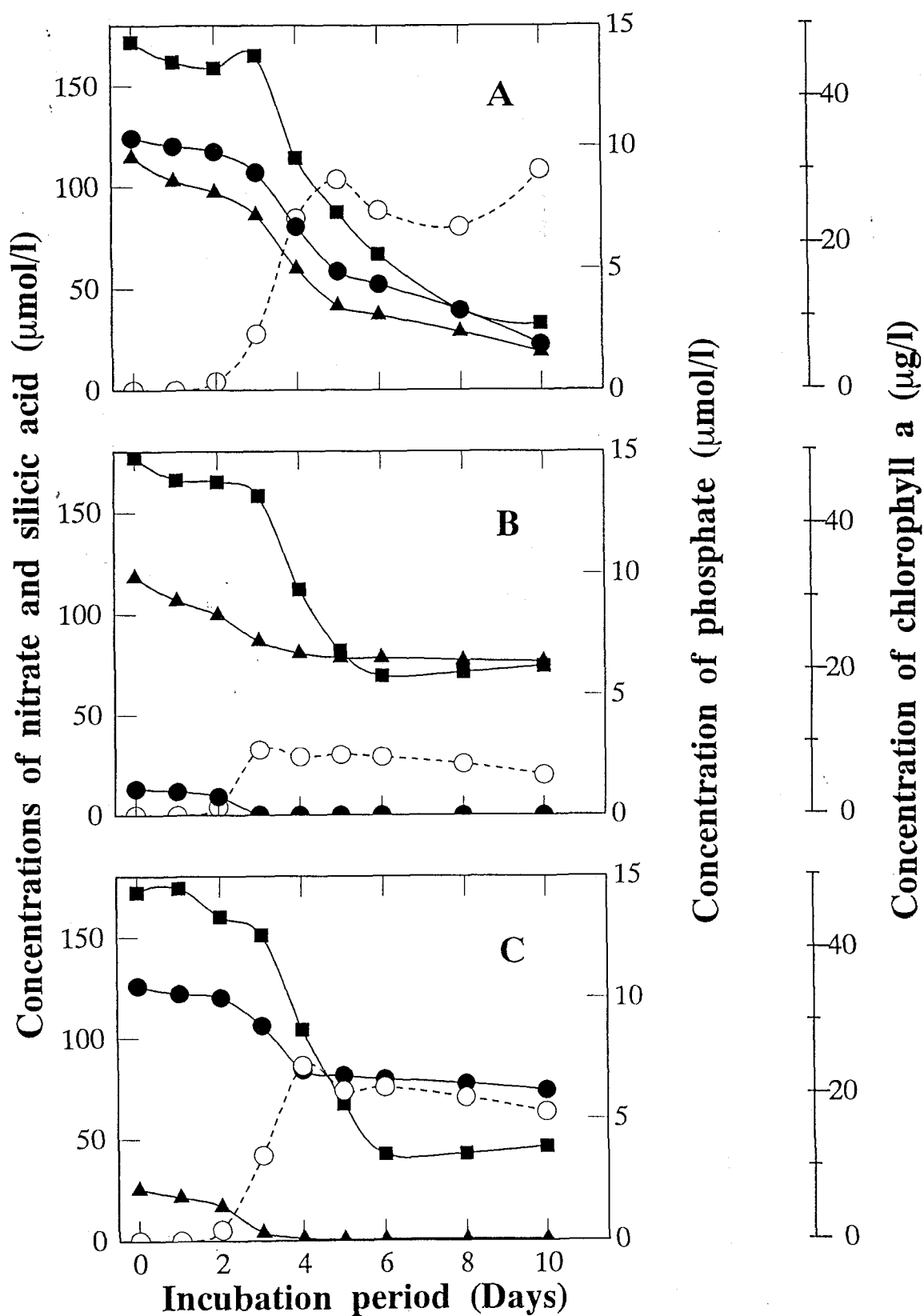


Figure 4.4 Temporal changes in concentrations of nitrate (closed circle), phosphate (closed triangle), silicic acid (closed square) and chlorophyll *a* (open circle) in batch culture experiments under (A) nutrient replete; (B) nitrogen limited; (C) phosphorus limited conditions.

なかった。一方、休眠孢子形成速度は栄養過剰条件で約 0.94 d^{-1} 、リン制限で 1.2 d^{-1} 、窒素制限で 2.1 d^{-1} であり、休眠孢子は窒素制限培養系で際立ってすばやく形成するという傾向が認められた。

窒素制限による休眠孢子形成の誘導現象は *Chaetoceros* 属のいくつかの種については広く知られている（例えば Hargraves and French 1983, French and Hargraves 1985, Kuwata and Takahashi 1990）。しかし、本実験に用いた *Ch. pseudocurvisetus* は溶存珪酸が過剰に存在すれば、窒素欠乏のみならず、リン欠乏や栄養が十分に存在する条件にあっても孢子形成を行っている。休眠孢子形成の誘導因子は窒素やリンの欠乏以外にも知られてはいるが（McQuoid and Hobson 1996）、栄養過剰な培養条件で孢子形成を行う種は、他に *Ch. didymus* が知られているのみであり（von Stosch et al. 1973）、極めて珍しい。*Ch. anastomosans* が窒素欠乏、高塩分条件で孢子形成を行うことが見いだされたように（2章, Oku and Kamatani 1997）、本種も注意の及ばない未知の因子により孢子形成が誘導されるのかもしれない。あるいは、井上・谷口（1995）が主張しているように、個体群維持を有利にするために孢子形成は栄養制限を受ける以前から、この珪藻の内的な機構により始まるのかもしれない。

2) 栄養塩類の同化とその比率

珪藻による栄養塩の消費パターンはいろいろな栄養条件の間で異なっていた（Fig. 4.4）。栄養過剰な培養液で培養した場合には、珪藻は実験期間を通じて栄養塩類を一定の比率で消費した（Fig. 4.4A）。窒素制限実験では（Fig. 4.4B）、硝酸塩濃度は培養開始後 3日 で分析の検出限界以下にまで低下していた。この培養系では硝酸塩の枯渇に伴いリン酸の消費速度が緩やかになり、実験終了時でもリン酸濃度は容易に測定可能なレベルで培養液中に残存していた。これらとは対照的に珪酸は硝酸塩が枯渇した直後の培養 3日目から 6日目の間で急速に消費されていた。この期間は休眠孢子が急速に増加している時期によく対応していた（Fig. 4.3）。

リン制限培養系では、リン酸は培養 4日目で枯渇したが（Fig. 4.4C）、硝酸塩の消費はその後も緩やかながら継続していた。珪酸の消費は培養 3～6日目が最も活発であったが、この時期は休眠孢子的形成時期と一致しているので、消費

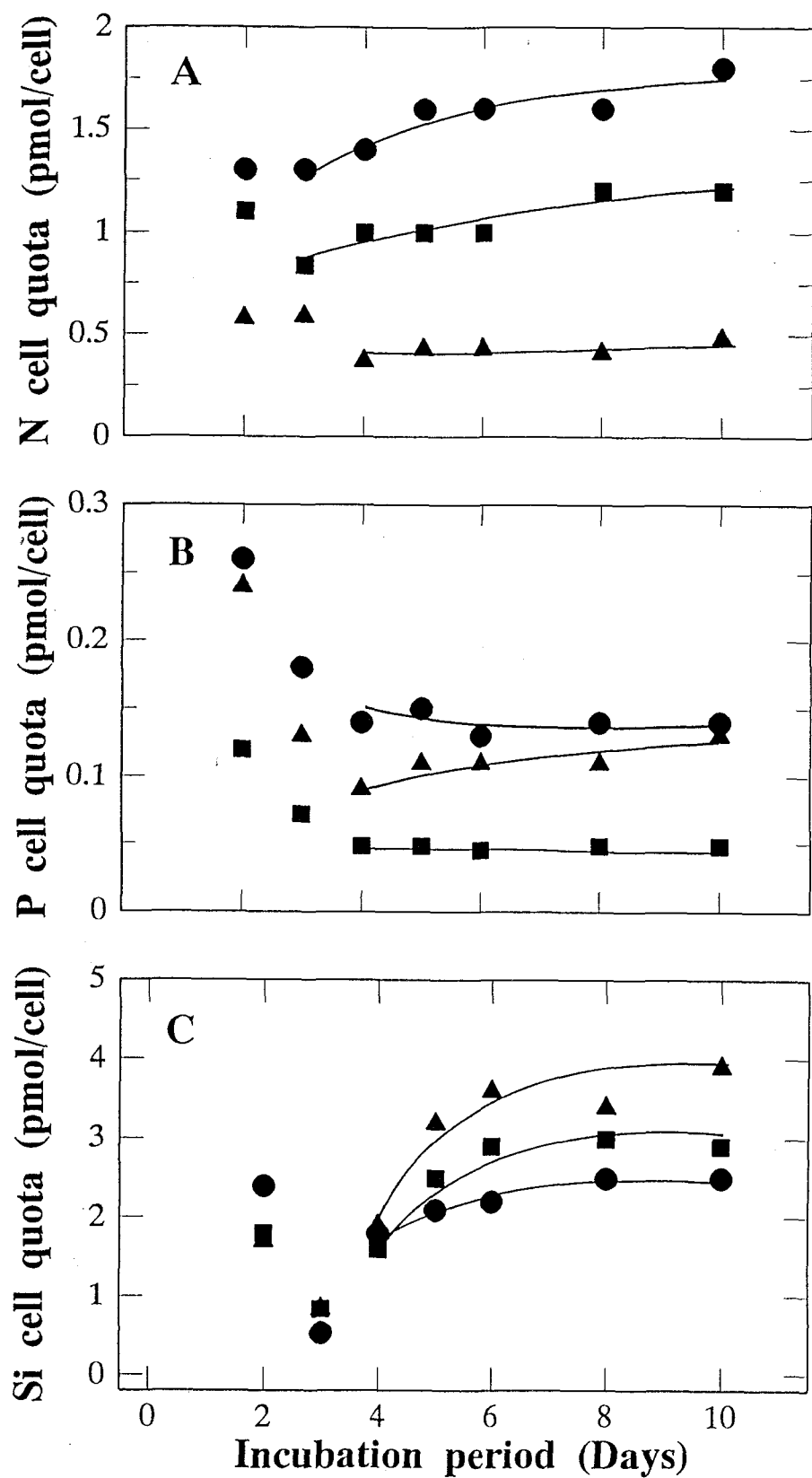


Figure 4.5. Time course changes in cell quotas for (A) nitrogen, (B) phosphorus and (C) silicic acid (pmol cell^{-1}) in batch culture for nutrient replete (circle), nitrogen limited (triangle) and phosphorus limited (square) conditions.

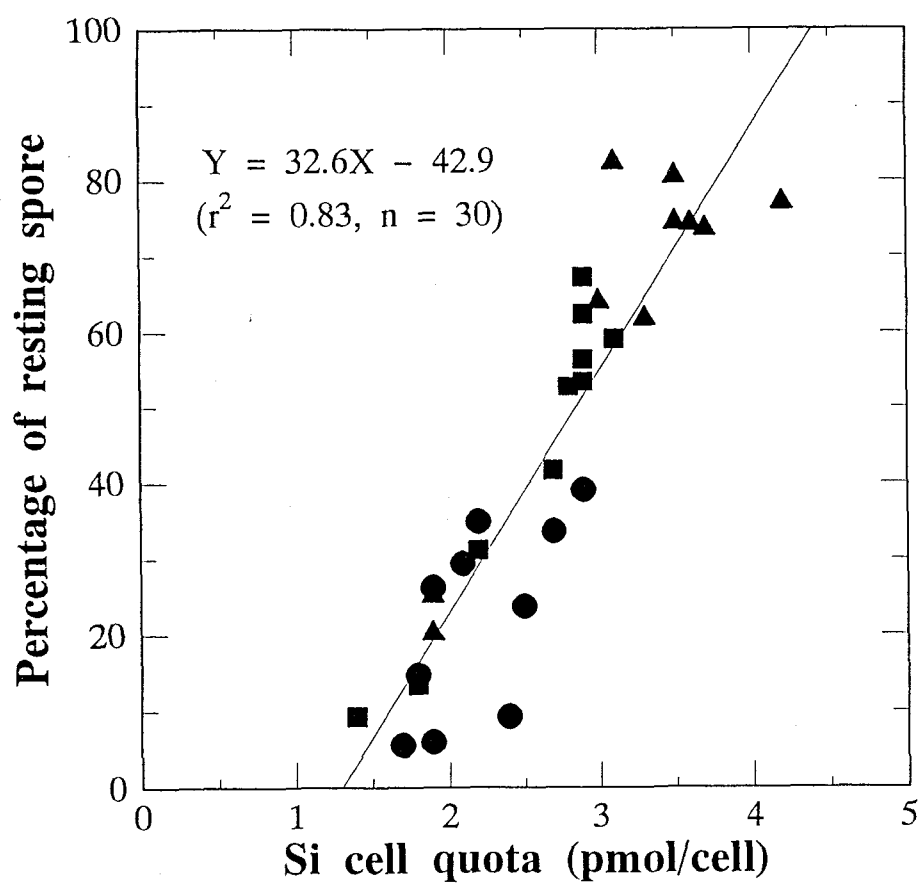


Figure 4.6 Relationship between Si cell quotas and resting spores as a percentage total cell number in batch culture for nutrient replete (circle), nitrogen limited (triangle) and phosphorus limited (square) conditions.

された珪酸は休眠孢子の厚い珪酸の被殻の形成に利用されているものと考えられる。

細胞に取り込まれた栄養塩の比 (N/P, Si/P, Si/N) を培養液からの消費量から計算してみた。Si/N と Si/P 比の両方は対数増殖期では減少しているが、定常期の初期に増加し、それ以後一定の値を保っていた。培養終了時点で、Si/N 比は以下の順で減少していた：窒素制限 (8.0) > リン制限 (2.4) > 栄養過剰 (1.4)。また、Si/P 比は以下の順であった：リン制限 (61) > 窒素制限 (30) > 栄養過剰 (18)。

N/P 比は Si/N や Si/P とやや異なる傾向を示していた。リン制限培養系と栄養過剰培養系では N/P 比は定常期を通して徐々に増加していったが、窒素制限下では N/P 比は定常期を通じて一定値であった。培養終了時点での N/P 比は以下の順で減少していた：リン制限 (25) > 栄養過剰 (13) > 窒素制限 (3.7)。栄養過剰条件下でのこの珪藻の栄養塩の同化モル比は N:P:Si で 13:1:17 であり、この値は他の珪藻の報告値 * (Si:N = 12:10, Furnas 1978, Brzezinski 1985, N:P = 12:1, Harrison et al. 1977) とよく一致していた。

3) 細胞あたりの栄養塩含量

細胞への栄養塩の取り込み量を培養液からの栄養塩の減少量から見積もり、その結果を Fig. 4.5 に示した。窒素含量は栄養条件により異なったが、定常期で含量の変化しない傾向はどの培養系でも同じであった (Fig. 4.5A)。培養終了時点での窒素含量は以下の順で減少していた：栄養過剰培養 ($1.6 \text{ pmol cell}^{-1}$) > リン制限培養 ($1.2 \text{ pmol cell}^{-1}$) > 窒素制限培養 ($0.5 \text{ pmol cell}^{-1}$)。

珪酸含量は全ての実験条件で同様なパターンを示した (Fig. 4.5C)。即ち対数増殖期で減少し、定常期のはじめから増加し、以後一定になった。実験終了時点での珪酸含量は、窒素制限培養 > リン制限培養 > 栄養過剰培養の順であった。

珪酸含量を各培養系のいろいろな段階での休眠孢子の割合に対してプロットしたところ、この2つの要素間にはよい正の相関関係が見られた ($r^2 = 0.83$, $n = 30$, Fig. 4.6)。この関係から、普通に増殖している栄養細胞の珪酸要求量は1.

* Harrison et al. (1977): *Chaetoceros debilis*, Furnas (1978): *Chaetoceros curvisetus*, Brzezinski (1985): 20 μm 以上の海産浮遊珪藻9種の平均値

3 pmol cell⁻¹, 休眠孢子の場合は4.4 pmol cell⁻¹に外挿される。このことは、栄養制限や他の生理的ストレスにより栄養細胞が休眠孢子を形成するときには、栄養細胞の状態からさらに 3 pmol cell⁻¹の付加的な珪酸を要求するということを示している（但し、この要求量は栄養細胞のサイズによりある範囲で変化するものと思われる）。一方、付加的な珪酸が存在しないときには、窒素欠乏条件下でも休眠孢子形成は困難であることがすでに知られている（Kuwata and Takahashi 1990）。したがって培養液中に珪酸が過剰に存在していることが、この珪藻の孢子形成に必要な不可欠な条件の一つといえる。

細胞のリン含量は対数増殖期に減少し、定常期を通して一定値を保った（Fig. 4.5B）。この時期の細胞のリン含量は以下の順で減少していた：栄養過剰培養＞窒素制限培養＞リン制限培養。リン含量の最大値と最小値の差はあまり大きくなく、0.05 pmol cell⁻¹から0.18 pmol cell⁻¹の範囲であった。仮に、リン制限下で増殖した細胞のリン含量が通常の細胞に対する下限を表し、栄養過剰条件下で増殖した細胞がリン含量の上限を示すものとすれば、この珪藻のリン含量の変動範囲は高々 3倍である。一方、細胞のリン含量は栄養条件によってオーダーの規模で変動する種も知られている（Mackereth 1953, 西島・深見 1993）。これらのことから考えると、リンの蓄積能力は種によって大きく異なると推測される。休眠の解除期において、貯蔵リンは各種の代謝過程へのリン酸の供給源として非常に重要な役割を果たしているといわれているので（藤伊1975）、孢子形成種のリン貯蔵能力に関する更なる検討が求められる。

4) 細胞内リン組成

各栄養条件の培養系から、対数増殖期（培養 3日目、主に栄養細胞からなる）、定常期の始め（培養 6日目）、培養終了時（10日目）のそれぞれの時期に細胞を収穫し、細胞内リン酸を連続抽出法により8画分に分画した。分析結果は以下のように要約される（Table 4.1）。

オルトリン酸と核酸は主要なリン化合物であり、細胞当たりの含量は多かった。ヌクレオチドと脂質リン画分は実験期間を通じて極めて少なかった。ヌクレオチド画分は休眠孢子的増加に伴い細胞当たりの含量が低下する傾向が認められた。リン制限培養における細胞内オルトリン酸含量は、窒素制限培養や栄養過剰培養

Table 4.1. Phosphorus composition in unialgal strain of *Chaetoceros pseudocurvisetus*, both vegetative cells and resting spores are included

Culture type	Days	Resting spores (%)	Phosphorus content (fmol/cell)							
			Nucleo- tide P	Ortho P	Acid sol. poly P	Sugar P	Nucleic acid P	Acid insol. poly P	Lipid P	Residual P
Nutrient replete	3	3.4	3.6	81.5	4.0	34.2	29.5	8.6	2.0	16.9
	6	25.0	1.3	41.2	6.2	21.1	31.6	7.4	2.3	19.0
	10	34.3	3.1	39.8	7.4	29.8	30.1	7.4	2.9	18.8
Nitrogen limited	3	4.2	2.3	65.9	8.8	17.6	15.9	9.2	1.7	9.0
	6	74.0	1.4	49.7	11.9	10.7	17.4	9.0	1.9	8.3
	10	78.8	0.4	58.5	11.7	8.1	25.1	14.4	2.7	9.4
Phosphorus limited	3	9.1	1.7	18.6	3.0	21.0	15.5	3.1	1.2	9.2
	6	53.2	0.5	16.3	3.0	1.4	14.0	2.1	1.2	6.8
	10	64.8	0.5	14.5	4.8	1.0	15.5	2.5	1.2	8.1

Each day corresponds to phase of growth in cultures as follows.

Day 3: exponential phase

Day 6: early steady-state phase

Day 10: steady state phase

のそれと比較して相対的に少なかった。これは、培養液中のリン酸の欠乏により、細胞内のリン酸プールからの消費が増えたことが原因と思われる。細胞当たりの糖リン酸含量は相対的に多かったが、他のリン画分と比較して、栄養条件や培養日数による変動が最も大きかった。即ち、栄養過剰条件では糖リン酸の細胞内含量は培養期間にかかわらず概ね一定量であったが、窒素制限およびリン制限条件では休眠孢子の増加にともなって糖リン酸含量が低下する傾向が認められた。酸可溶性・酸不溶性ポリリン酸はどちらも細胞中の全リンに比較してある一定量を保った。核酸含量はリン制限培養と栄養過剰培養の両方では実験期間を通して一定値であったが、窒素制限培養系では対数増殖期よりも定常期の方が核酸含量は多くなる傾向が認められた。脂質リンとタンパク様リンの細胞内含量はどの栄養条件でも培養期間を通じて一定レベルを保った。

生理学的には、リンは 3つのカテゴリーに分類することができる。即ち、1) オルトリンやポリリンのような貯蔵リン、2) 核酸やリン脂質のように細胞内構造物として絶対的に必要不可欠なリン、3) ヌクレオチドや糖リン酸のような無数の代謝経路と関連したリンである。

オルトリン酸やポリリン酸は主要な貯蔵リンであり、リン酸過剰の条件下では細胞内の液胞に大量に蓄えられることが高等植物 (Bielecki 1968, Bielecki and Ferguson 1983, Marschner 1986) や緑藻 (Ketchum 1939, Kuenzler and Ketchum 1962), 珪藻の栄養細胞 (Crawford 1973) で知られている。しかし、リン酸過剰の条件下で形成した *Chaetoceros pseudocurvisetus* の休眠孢子では、オルトリン酸やポリリン酸の過剰蓄積は認められなかった。この原因は、休眠孢子形成により液胞の体積が減少し (Hargraves and French 1983), オルトリン酸やポリリン酸の貯蔵場所が限定されていることが原因の一つとして指摘できる。大量の貯蔵リンを持つことができる珪藻種 (例えば *Asterionella formosa* や *Skeletonema costatum*, Mackereth 1953, Miyata et al. 1986) が休眠孢子を形成しない種であるという事実も、この考えを支持している。

主要な細胞構造物である核酸と脂質リンは全ての栄養条件でどのステージで収穫された試料中でも一定値を示した。この理由は細胞が遺伝や膜構造の維持のために絶対的に必要とするリン化合物の量は休眠孢子・栄養細胞のどちらでも変わらないことを示していると考えられる。

栄養過剰条件では細胞内の糖リン酸含量は実験期間を通して概ね一定値を保った。しかし、リン制限あるいは窒素制限培養の場合では、細胞内の糖リン酸含量は対数増殖期の間は相対的に高く、休眠孢子が優占してきた時の定常期で急に低くなっている (Table 4.1)。全く同様のことがヌクレオチド画分についても起こっている。

ヌクレオチドや糖リン酸は、光合成や呼吸代謝、生合成のあらゆる場面に關与しており、構造成分としてのリン化合物 (リン脂質やリタンパク, DNA など) に比べると、細胞内濃度が増減しやすい。糖リン酸はリン脂質や DNA のようなリン化合物よりも代謝時間は早く、高等植物においてそのオーダーは分単位であることもその原因の一つである (Bielecki 1973, Bielecki and Ferguson 1983)。このように糖リン酸含量は代謝活動の状態を敏感に反映するので、呼吸、リン酸化、あるいはその関連過程の活性の指標としても使われている (Sawada et al. 1989)。高等植物においては、種子のような休眠状態の細胞の糖リン酸含量が低いことも知られている (Hall and Hodges 1966, Mukherji et al. 1971)。

これらの報告から総合的に判断すれば、本研究に用いた *Ch. pseudocurvisetus* の休眠孢子の糖リン酸・ヌクレオチド含量が低いことは、呼吸や光合成を始めとした各種の代謝の活性が抑制されていることを表しているものといえよう。これは 5 種の珪藻の休眠孢子の暗呼吸速度が、栄養細胞のそれよりも遅いという報告とも一致する内容を持つ (French and Hargraves 1980)。 *Ch. pseudocurvisetus* の休眠孢子は休眠期間を生き残るためのエネルギー源として大量のグルコースをポリサッカライドの形態で蓄えていることが知られている (Kuwata et al. 1993)。このことと本研究の結果を併せて考えると、珪藻の休眠孢子が低いレベルの糖リン酸含量 (つまり代謝活性が低い) と大量の貯蔵グルコースという、長期間の生存にとってエネルギー的に有利な性質を持っていることが明らかである。

5) 今後の課題

今回の実験では、細胞はすべて明条件下で収穫されたにもかかわらず、休眠孢子のヌクレオチドや糖リン酸含量は少なかった。これらの光合成・解糖系に関連した中間代謝成分の含量が少ないことは、この珪藻の孢子の代謝活性が明条件下でも抑えられていることを示唆している。一方、同じ条件下で収穫された栄養細胞の

糖リン酸含量とヌクレオチド含量は休眠孢子よりも多いので、代謝活性は高く保たれているものと推測される。このことから、休眠孢子は栄養細胞とは根本的に異なる代謝系を持つ特殊な細胞であることがうかがえる。この両者の細胞の代謝系の具体的な違いは、光合成や解糖系などの個々の代謝系に関連した生化学成分組成を詳細に調べることにより明らかになるものと思われる。ここから休眠孢子形成の生態学的意義が明らかになる道が開けるものと考えられ、これは今後の重要な研究課題といえる。

4. 4 まとめ

休眠孢子と栄養細胞の生理的な違いを明らかにするために、珪藻 *Chaetoceros pseudocurvisetus* の休眠孢子形成過程と細胞内リン組成を様々な栄養条件で調べた。結果は以下のようにまとめられる。

- 1) 休眠孢子形成は十分量の珪酸の存在の下では窒素欠乏だけでなくリン欠乏でも誘導された。さらに、休眠孢子形成は栄養過剰条件でも確認され、いろいろな環境ストレスが孢子形成のトリガーとして作用することを示唆している。
- 2) どの栄養条件でも栄養細胞は休眠孢子を作るためにおよそ 3 pmol/cell の付加的な珪酸を要求した。過剰の珪酸は休眠孢子形成に必須と考えられる。
- 3) 休眠孢子形成に伴い、糖リン酸とヌクレオチドの細胞内含量は低下した。一方、栄養細胞ではこれらの物質の含量の低下は認められなかった。この結果は、休眠孢子と栄養細胞が本質的に異なる代謝系を持つことを示している。

第5章 休眠孢子 of 光合成色素とヌクレオチド組成

5. 1 はじめに

第4章の実験結果は、休眠孢子の代謝活性は栄養細胞よりも抑えられていることを示唆していた。即ち、休眠孢子では光合成や呼吸の活性の指標となる糖リン酸及びヌクレオチド画分のリン含量が栄養細胞に比べて低いレベルであった (Oku and Kamatani 1995)。このことは、休眠孢子と栄養細胞との間では光合成機能を始めとした各種の代謝の状態が基本的に異なっていることを示している。したがって、光合成特性や代謝物質の組成・含量を詳細に調べれば、両者の細胞の機能的な違いをより明確にできると考えられる。

一般に、植物の光合成活性は蛍光収率や光合成色素量などと深く関わっており (Demmig et al. 1989, Thayer and Bjorkman 1990, Demers et al. 1991), 植物はこれらの要素を変化させることにより自らの光合成活性を調節し、様々な光条件に適応していると考えられている。このような適応様式は、陸上植物だけでなく、珪藻を始めとした植物プランクトンの栄養細胞でも知られているので (Sakshaug et al. 1987, Latasa 1995), 休眠孢子においてもそれらの存在が予測される。また、光合成活性や呼吸速度の低下を反映して ATP の細胞含量の減少の起こることが鞭毛藻 *Scrippsiella trochoidea* の休眠シスト形成で知られているので (Binder and Anderson 1990, Lirdwitayaprasit et al. 1990), 珪藻の休眠孢子形成においても同様の現象の存在が予測される。

これらの背景から、本章では珪藻 *Ch. pseudocurvisetus* の休眠孢子と栄養細胞の単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光, 光合成色素, ヌクレオチド組成に着目し、両者の細胞の光合成過程・エネルギー代謝系の違いの具体的な証拠を得ることを目的とした一連の研究を行った。

5. 2 材料と方法

1) 培養方法

休眠孢子と栄養細胞の代謝の違いを比較生理学的観点から明らかにするために、5. 5l のポリカーボネート製ボトルを用い、以下の3 種の培養系を設定した。

- | | |
|----------------|------------------------------|
| 1) 栄養過剰培養系 | N:P:Si=120:10:180 (μ M) |
| 2) 窒素, 珪酸制限培養系 | N:P:Si= 20:10: 27 (μ M) |
| 3) 窒素制限培養系 | N:P:Si= 20:10:180 (μ M) |

これらの栄養添加濃度と組成比は第4 章の実験を参考に決定した。1) は栄養細胞, 2) は窒素欠乏下の栄養細胞, 3) は休眠孢子の収穫を目的にしている。窒素の添加濃度はヌクレオチドの分析時に必要な試料量を概算し、 20μ M とした。光条件は $160 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ とし、明暗周期は14L:10D とした。培養温度は 20°C に保持した。

前培養は前述の光、温度条件で行い、培養液は N:P:Si=50:5:50 (μ M) のやや薄い f/4 培養液とした。これは各培養系が前培養の影響を受けるのを避けるためである。前培養に先立ち、珪藻株はペニシリン G カリウム・ストレプトマイシン・クロラムフェニコール混液による抗生物質処理により滅菌した (Hoshaw and Rosowski 1978)。この無菌株を用いて前培養を2 日行い、対数増殖期に達した前培養25ml を各培養系 (5l) に接種した。

2) 各要素の分析方法

培養期間中、各培養系から約100 ml の試料を分取し、*in vivo* 蛍光、硝酸塩、リン酸、珪酸濃度測定用の試料とした。*in vivo* 蛍光の測定には蛍光光度計 (日立204 型蛍光光度計) を用いた。励起波長は436 nm, 測定波長は660 nm とした。栄養塩類の分析法は第4 章に記述した方法で行った。

光合成色素・ヌクレオチド分析用の珪藻試料は以下のように収穫した。まず、3 種の培養系それぞれから、培養2 日目に光合成色素の定量のための栄養細胞を収穫した。次に、栄養過剰培養系からは培養3 日目に栄養細胞を、窒素, 珪酸制

限培養系からは5 日目に栄養細胞（栄養枯渇条件）を，窒素制限培養系からは7 日目に休眠胞子をそれぞれ収穫した。細胞収穫時の光条件は，暗期から明期に移行してから10時間を経過した時点に統一した。また，光条件の違いによる色素組成の変化を調べるために，栄養細胞（栄養枯渇条件）と休眠胞子の一部を暗条件に24時間保持した試料も採取した。休眠胞子については，これとは別に様々な光条件・培養日数における色素組成も調べた。

収穫した珪藻細胞は直ちに光合成色素とヌクレオチドの分析に供した。ヌクレオチドは明条件で収穫された試料についてのみ測定した。Xanthophyll 色素とヌクレオチドは第3 章で確立した HPLC 法で分析した。但し，Chl. *a* はアセトン抽出－吸光光度法で測定した（Jeffrey 1975）。

3)発芽実験

栄養枯渇条件下の栄養細胞（窒素・珪酸制限培養系）と休眠胞子（窒素制限培養系）の生き残りを比較するために，両方の細胞を栄養欠乏条件のまま，1)に示した温度・光条件で49日間培養した。培養後の栄養細胞と休眠胞子をそれぞれ100ml の f/10培養液に接種し， $160 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，14L:10D，20° C の条件で培養した。それぞれの培養系の *in vivo* 蛍光を24時間毎に測定し，発芽とそれに続く栄養増殖過程を比較した。

5. 3 実験結果

1) 各栄養条件における増殖曲線と栄養吸収特性

各培養系の *in vivo* 蛍光の経日変化を Fig. 5. 1に示す。栄養過剰，窒素制限，窒素・珪酸制限のどの培養系でも，珪藻は接種直後から活発に増殖している（Fig. 5. 1A）。窒素・珪酸制限培養系では培養3 日目，窒素制限培養系で4 日目，栄養過剰培養系で4 日目までが対数増殖期であると見られる。栄養制限をかけた培養系では，短い定常期が見られた後に，蛍光がやや弱まる傾向を示していたが，栄養過剰培養系では培養終了日まで蛍光は増加し続けた。

窒素制限培養系では培養4 日目，また窒素・珪酸制限培養系で培養3 日目に硝酸塩は枯渇した（Fig. 5. 1B）。窒素・珪酸制限培養系では，培養3 日目に珪酸

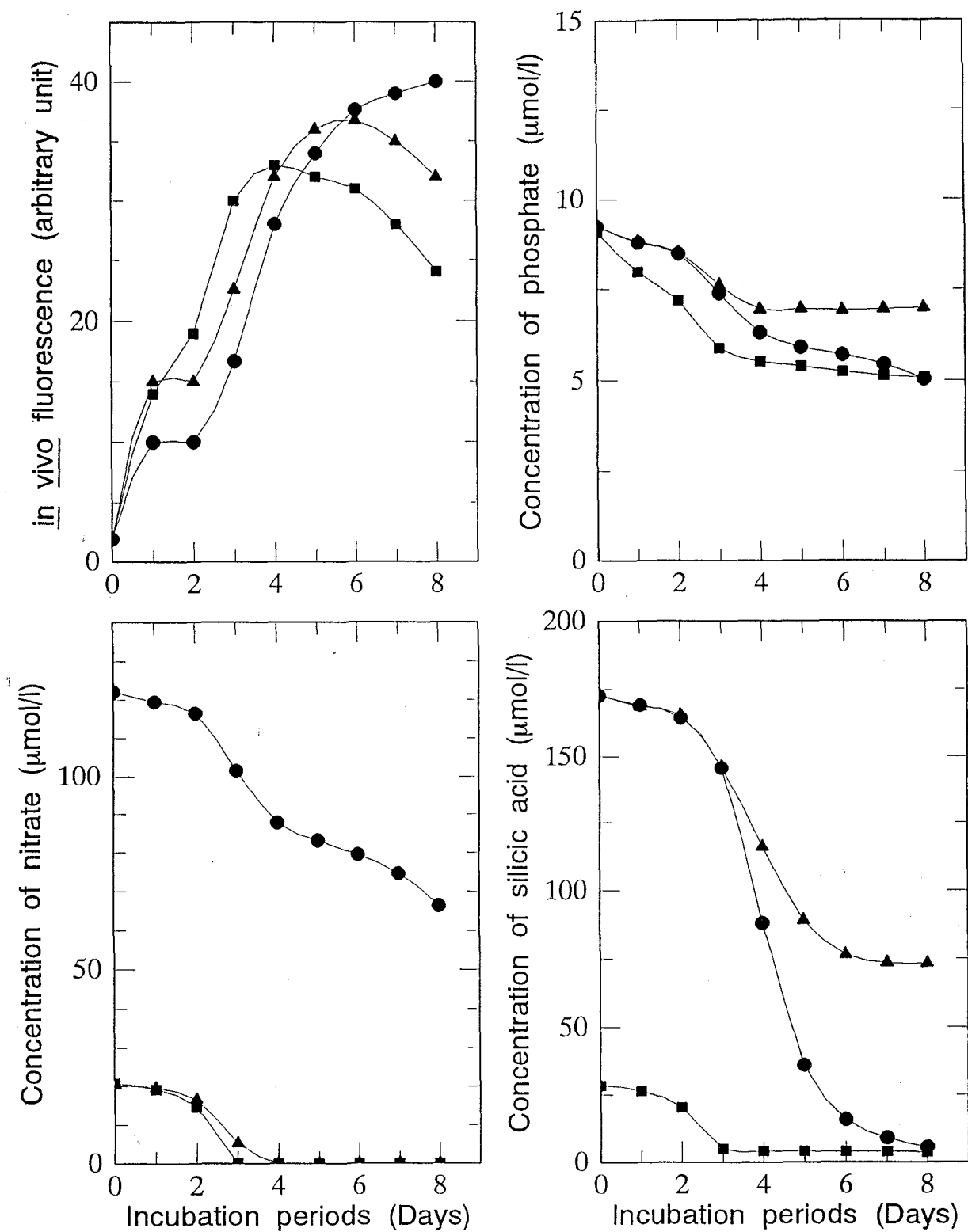


Figure 5. 1. Temporal changes in *in vivo* fluorescence, concentrations of nitrate, phosphate and silicic acid. Nutrient replete (circle); nitrogen limited (triangle); nitrogen and silicic acid limited (square) culture.

も枯渇していたにも拘わらず (Fig. 5. 1D), リン酸の取り込みだけは停止することなく, 培養終了時まで続いていた (Fig. 5. 1C)。このことは, 窒素・珪酸が欠乏した状態でも珪藻細胞のリン酸代謝は停止していないことを示唆している。一方, 窒素制限培養系では, 培養4 日目の硝酸塩の枯渇以降, 休眠孢子形成に伴う急激な珪酸の取り込みが見られたが, 培養7 日目以降は珪酸の取り込みも停止した。また, リンの取り込みは硝酸塩枯渇と同時に停止した (Fig. 5. 1C)。このように, 培養液中に存在する珪酸の濃度により, 窒素制限条件下でのリン酸の取り込みに違いが生じることが分かった。

2) 細胞収穫時における各培養系の栄養塩取り込み比と細胞の形態

細胞収穫時における各培養系の栄養塩取り込み比を Table 5. 1に示す。各培養系の特徴は以下のように要約できる。1)N:P の取り込み比が最も低いのは窒素・珪酸制限培養系であり, 以下窒素制限培養系, 栄養過剰培養系の順であった。2) Si:P 比は窒素・珪酸制限培養系で最も低く, 以下栄養過剰, 窒素制限培養系の順であった。3)Si:N 比は窒素制限培養系で最も高く, 栄養過剰培養系と窒素・珪酸制限培養系ではほぼ同じ値を示した。

培養2 日目にはどの培養系でも栄養塩は十分に残存していた (Fig. 5. 1)。しかし, 培養液から吸収された N:P 比は栄養過剰培養系と比較して窒素制限や窒素・珪酸制限培養系では明らかに低かった。このことは, N:P の取り込み比は栄養枯渇以前から環境水中の栄養塩組成に大きく影響を受けることを示唆している。

各培養系に特徴的な細胞の形態を Fig. 5. 2に示した。培養2 日目の各培養系と, 培養3 日目の栄養過剰培養系は Fig. 5. 2A に示したような栄養細胞で占められていた (以後, 栄養細胞という言葉はこの形態の細胞を指すものとする)。培養5, 6日目の窒素・珪酸制限培養系の珪藻細胞は, ほぼ全てが広い面積の液胞と著しく縮小したクロロプラストを持っていた (Fig. 5. 2B)。この細胞の栄養細胞との細胞内容物の形態的な違いは明らかであり, 栄養欠乏によりオルガネラの形態変化が起こっていることを示している。そこで本論文では以後この細胞を

Table 5. 1. Consumed nutrient molar ratio in each growth phase under various culture conditions.

Culture type	Days	Resting Spores (%)	Depletion	Consumed nutrient molar ratio		
				N:P	Si:P	Si/N
Nutrient replete	2	0.0	non	7.6	7.4	1.4
	3	0.3	non	11.2	14.7	1.3
Nitrogen silicate limited	2	0.0	non	5.6	7.4	1.3
	5	0.0	N & Si	5.7	6.6	1.2
	6	0.0	N & Si	5.4	6.5	1.2
Nitrogen limited	2	0.0	non	5.6	11.1	2.0
	7	99.2	N	9.0	44.0	4.8
	8	98.1	N	9.1	44.6	4.9

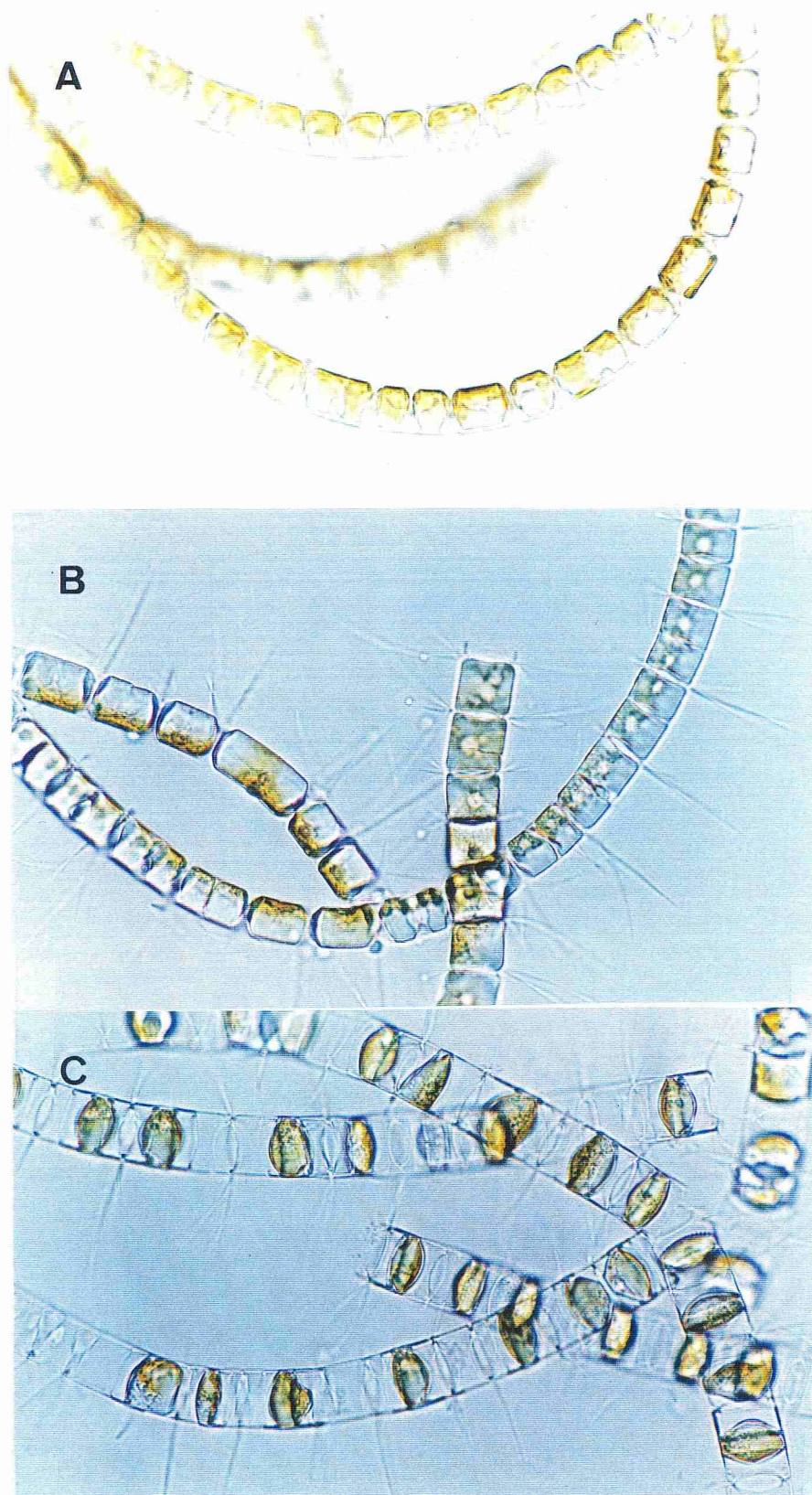


Figure 5. 2. Light micrographs of *Chaetoceros pseudocurvisetus* in each culture. (A) Vegetative cells in nutrient replete culture on Day 3; (B) nutrient starved cells of nitrogen and silicic acid limited culture on Day 5; (C) resting spores in nitrogen limited culture on Day 7. Scale bar = 20 μ m.

Table 5.2 Levels of xanthophyll pigments in diatom cells under various light and nutrient conditions.

Culture type	Days	Light	% of spores (cell types)	Chl. <i>a</i> . (fmol/cell)	Xanthophyll content (mmol/mol chl. <i>a</i>)				
					Fuco	Diadino	Diato	Dd+Dt	% Diato
Nutrient replete	2	10L	0.0 (V)	8.2	713±13	261± 9	70± 4	331	21.1
	3	10L	0.3 (V)	6.7	673±44	313±31	86± 20	399	21.5
Nitrogen silicate limited	2	10L	0.0 (V)	15	648±12	177± 9	106±12	283	36.6
	5	10L	0.0 (S)	4.3	798±32	527±13	212±11	739	28.6
	6	24D	0.0 (S)	4.6	789± 5	694±14	51±11	745	6.9
Nitrogen limited	2	10L	0.0 (V)	12	721±30	223±10	86±20	309	27.7
	7	10L	99.2 (R)	3.3	829±32	118±11	385±21	503	77.0
	8	24D	98.1 (R)	3.6	845±10	406±24	203±24	609	33.8

Fuco = fucoxanthin. Diadino = diadinoxanthin. Diato = diatoxanthin.

Cell types are as follows (cf. Fig. 5.2): V = vegetative cells, S = nutrient starved vegetative cells, R =resting spores.

栄養細胞と区別して、栄養欠乏細胞*と呼ぶことにする。窒素・珪酸制限培養系では、孢子形成に必要な珪酸が不足しているために（cf. Fig. 4.6），休眠孢子は全く観察されなかった。一方，培養7，8日目の窒素制限培養系では，ほぼ全ての珪藻細胞は休眠孢子で占められていた（Fig. 5.2C）。

3) 光合成色素組成の含量と組成

各栄養条件・培養日数における *Ch. pseudocurvisetus* の細胞当たりの Chl. *a* 含量と単位クロロフィル当たりの Xanthophyll 色素含量を Table 5.2 に示した。

細胞当たりの Chl. *a* 含量は相対的に栄養細胞で多く，栄養欠乏細胞や休眠孢子では少なくなる傾向が見られた。

単位クロロフィル当たりの Fucoxanthin 含量は，1) 培養2 日目では，各培養系において650～720 mmol の幅に収まっており，栄養条件の違いによる大きな変化は認められない。2) 培養2 日目の栄養細胞と比較すると，栄養欠乏細胞や休眠孢子中で濃度が高い傾向が見られるが，その割合は20%以内でありわずかであった。3) 栄養欠乏細胞と休眠孢子中の Fucoxanthin 含量は，明条件・暗条件のどちらでも変化が認められなかった。

Diadinoxanthin と Diatoxanthin は併せて Xanthophyll cycle 色素と呼ばれている。単位クロロフィル当たりの Xanthophyll cycle 色素量は栄養細胞（培養2 日目）で 300 mmol 前後と栄養条件によらず概ね一定であった。栄養細胞中の Xanthophyll cycle 色素に占める Diatoxanthin の割合は，培養2 日目の光照射10時間の時点ではどの培養系でも21から37%であり，栄養条件による違いは小さかった。

栄養欠乏細胞と休眠孢子では Xanthophyll cycle 色素は大幅に増加しており，培養2 日目の栄養細胞（栄養過剰培養系）の2 倍ないし2.5 倍の含量であった。これらの細胞の Xanthophyll cycle 色素に占める Diadinoxanthin あるいは Diatoxanthin の割合は光条件によって大きく変化した。即ち，明条件では栄養欠乏細胞と休眠孢子の両方でともに Diadinoxanthin が減少し，Diatoxanthin が増加していた。一方，暗条件ではその逆の現象が見られた。このことから，休眠孢子と栄養欠乏細

* この細胞は Kuwata et al. (1993) が休眠細胞（resting cell）と呼んでいるものと同じである。しかし，栄養欠乏により増殖阻害を受けて代謝活性が低下した細胞を休眠細胞と呼ぶには問題があるので，本論文では栄養欠乏細胞（nutrient starved cell）の呼称を用いることとした。

胞は Xanthophyll cycle（後述）を持つことが明らかである。しかしながら、これらの両方の細胞における脱エポキシ化の度合い（= Xanthophyll cycle 色素に占める Diatoxanthin の割合）は大きく異なっていた。Xanthophyll cycle 色素に占める Diatoxanthin の割合は、明条件で比較すると、栄養欠乏細胞では29%と低かったが、休眠孢子では77%と高い値を示した。さらに、単位クロロフィル当たりの Diatoxanthin 含量は休眠孢子で最も高かった。このことから Diadinoxanthin の脱エポキシ化は休眠孢子中で最も活発であることが分かった。

4) 単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光

培養2日目における単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光は、栄養過剰培養系で最も低く、窒素制限培養系で最も高かった（Table 5.3）。この時点ではどの培養系でも栄養塩類は枯渇していないことから、各培養系の間での単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光値の差は、培養液の栄養塩類組成比（N:P 比）の違いが珪藻細胞の光合成活性に影響を与えた結果生じたものと考えられる。

単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光は栄養欠乏細胞で強くなる傾向が認められたが、この値は休眠孢子ではさらに高くなり、培養3日目の栄養細胞（栄養過剰培養系）と比較すると約5倍にも達した。

栄養欠乏細胞と休眠孢子の単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光は、光照射10時間の時点で収穫した細胞と、これを24時間暗条件に保持した細胞とでは明瞭な変化は認められなかった。

5) ヌクレオチド類の含量と組成

明条件で収穫した *Ch. pseudocurvisetus* の栄養細胞と、栄養欠乏細胞、休眠孢子のそれぞれの（糖）ヌクレオチド組成を比較した。これらのヌクレオチドの一部は光合成過程に深く関連する代謝産物なので、細胞当たりの含量と単位クロロフィル当たりの含量の両方で示した（Table 5.4, 5.5）。

細胞当たりの各種ヌクレオチド含量は栄養細胞では最も多く、栄養欠乏細胞では低下しており、休眠孢子では最も少なくなっていた（Table 5.4）。細胞のエネルギー状態の指標となる ATP 含量は、栄養欠乏細胞では栄養細胞の64%であ

Table 5. 3 Chlorophyll fluorescence of vegetative cells, nutrient starved cells and resting spores of *Chaetoceros pseudocurvisetus* under various nutrient and light conditions.

Culture type	Days	Light	Resting Spores (%)	Depletion	Fluorescence (Fl/chl. <i>a</i>)
Nutrient replete	2	10L	0.0 (V)	non	0.43
	3	10L	0.3 (V)	non	0.37
Nitrogen silicate limited	2	10L	0.0 (V)	non	0.59
	5	10L	0.0 (S)	N & Si	0.86
	6	24D	0.0 (S)	N & Si	0.84
Nitrogen limited	2	10L	0.0 (V)	non	0.76
	7	10L	99.2 (R)	N	1.87
	8	24D	98.1 (R)	N	1.54

Cell types are as follows (cf. Fig. 5.2): V = vegetative cells, S = nutrient starved vegetative cells, R =resting spores.

Table 5. 4. Levels of intermediates in diatom cells under various light and nutrient conditions (in fmol/cell). All cells exposed for 10 hours to light ($160 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Metabolites	Amount (fmol/cell)			Ratio (%)	
	Vegetative cells (V)	Nutrient starved cells (S)	Resting spores (R)	S/V	R/V
AMP	0.32± 0.02	0.13± 0.01	0.07± 0.02	41	22
ADP	0.68± 0.02	0.27± 0.02	0.11± 0.02	40	16
ATP	0.91± 0.03	0.58± 0.07	0.38± 0.06	64	42
ADPG	0.27± 0.01	0.38± 0.03	0.06± 0.02	141	22
UDP	0.11± 0.02	0.03± 0.00	B.D.	27	–
UTP	0.21± 0.01	0.09± 0.01	0.09± 0.02	43	43
UDPG	0.25± 0.03	0.10± 0.01	0.07± 0.00	40	28
Total	2.75	1.58	0.78	57	28

B.D.: below detection limit

Vegetative cells (V): Day 3 in nutrient replete culture.

Nutrient starved cells (S): Day 5 in nitrogen and silicic acid limited culture.

Resting spores (R): Day 7 in nitrogen limited culture.

Table 5. 5. Levels of intermediates in diatom cells under various light and nutrient conditions.
All cells exposed for 10 hours to light ($160 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Metabolites	Amount (mmol/mol chl. <i>a</i>)			Ratio (%)	
	Vegetative cells (V)	Nutrient starved cells (S)	Resting spores (R)	S/V	R/V
AMP	48± 3	30± 2	21± 5	63	44
ADP	100± 3	64± 4	34± 5	64	34
ATP	134± 5	135±19	108±17	101	81
ADPG	40± 1	89± 7	17± 5	223	43
UDP	16± 4	8± 1	B.D.	50	<38
UTP	31± 1	22± 2	27± 5	71	87
UDPG	37± 5	23± 2	21± 1	62	57
Total	406	371	226	91	56
Ratio					
ATP/ADP	1.3	2.1	3.2	160	230
ADPG/Adenine ⁽¹⁾	0.12	0.28	0.09	230	78
AEC ⁽²⁾	0.65	0.73	0.77	–	–

B.D.: below detection limit (about 6 mmol/mol chl.*a*)

1: $\text{ADPG/Adenine} = \text{ADPG}/(\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP} + \text{ADPG})$

2: $\text{AEC} = (\text{ATP} + 0.5\text{ADP})/(\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP})$

Vegetative cells (V): Day 3 in nutrient replete culture.

Nutrient starved cells (S): Day 5 in nitrogen and silicic acid limited culture.

Resting spores (R): Day 7 in nitrogen limited culture.

り、休眠孢子では42%にまで低下していた。休眠孢子では、どのヌクレオチド成分含量も栄養細胞より少なくなっており、細胞当たりのヌクレオチド総量は栄養細胞の28%の含量にまで減少していた。一方、栄養欠乏細胞ではADPGの過剰蓄積が起こっており、栄養細胞の141%にまで増加していた。栄養欠乏細胞では、細胞当たりのヌクレオチド総量は栄養細胞の57%と、休眠孢子の値の2倍を示した。孢子形成に伴い、細胞当たりのヌクレオチド含量が減るという結果は第4章の実験結果ともよく一致している。

単位クロロフィル当たりのヌクレオチド量は、細胞当たりのヌクレオチド含量と概ね同じ傾向を示した（Table 5.5）。即ち、栄養細胞中で多く、栄養欠乏細胞や休眠孢子では相対的に少なかった。単位クロロフィル当たりのADPG量は栄養細胞よりも栄養欠乏細胞中で著しく多くなっている傾向も同じであったが、増加の度合いは大きく、栄養細胞の223%に達した。一方、休眠孢子中では単位クロロフィル当たりのADPG量は栄養細胞よりも著しく減少していた。

全ての（糖）アデニンヌクレオチドに占めるADPGの割合は栄養欠乏細胞で最も高く、28%を占めた。一方、休眠孢子中ではこの値は9%に留まった。栄養欠乏細胞中の単位クロロフィル当たりのATP量は、栄養細胞（栄養過剰培養系）とほとんど同じであったが、AMP、ADP量は大きく減少していた。休眠孢子中の単位クロロフィル当たりのAMP、ADP、ATP量はともに栄養細胞よりも少なく、やはりAMPとADPが大きく減っていた。

単位クロロフィル当たりのヌクレオチド量の合計を取ると、栄養細胞（栄養過剰培養系）、栄養欠乏細胞、休眠孢子でそれぞれ406, 371, 226 mmol mol⁻¹ chl. *a* となった。栄養細胞と栄養欠乏細胞に比べて休眠孢子中で著しく低下している点が注目される。

6) 休眠孢子における光合成色素の日変化

キサントフィルサイクルの光条件の変化に対する応答特性を知るために、様々な積算光量子量の条件で休眠孢子を収穫し、その色素組成を調べた（Fig. 5.3）。このクロマトグラムは試料量で標準化してあるので、ピークの高さは相互に比較できる。

Diadinoxanthinのピークは光照射時間が長くなるとともに低下してゆく一方で、

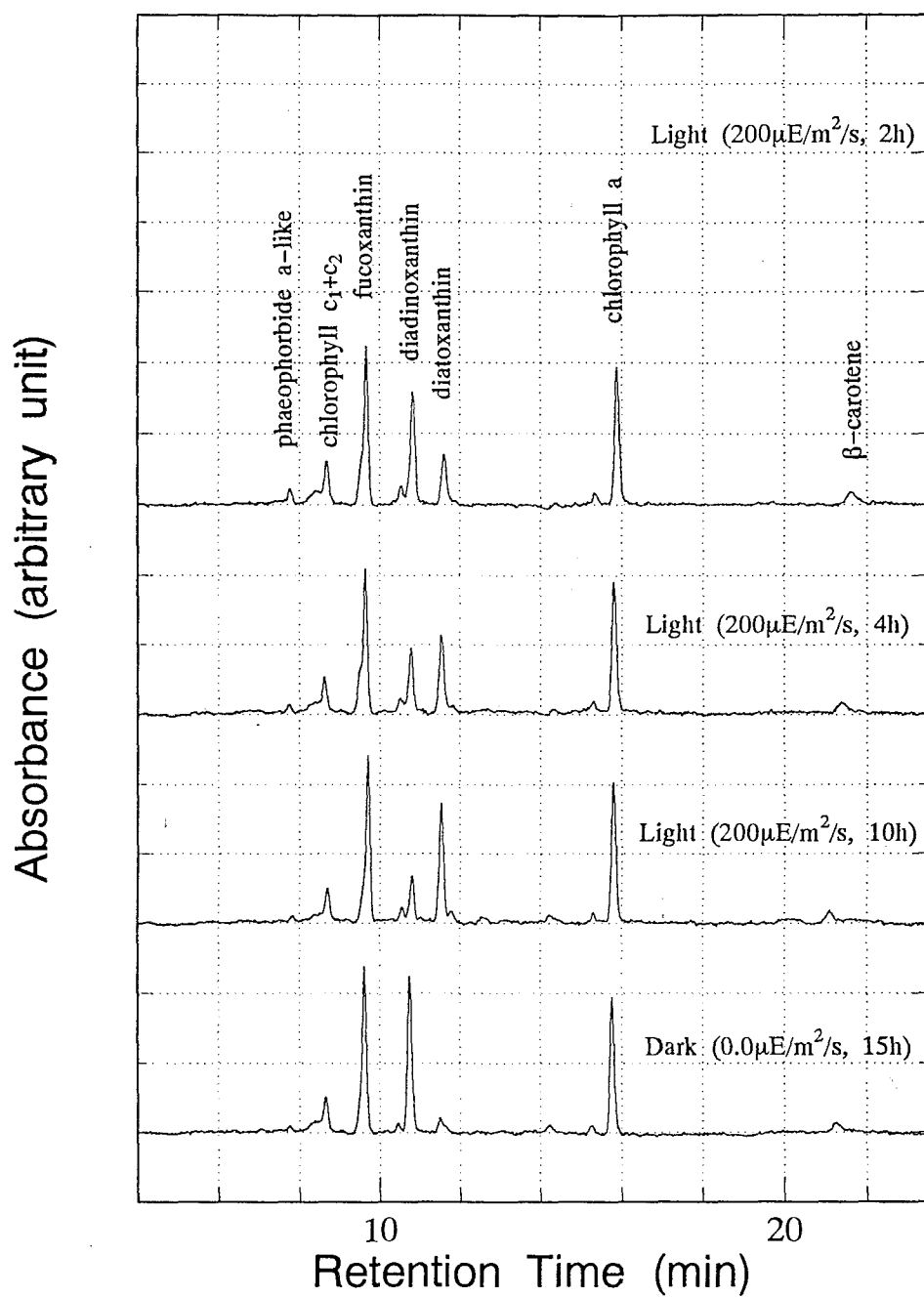


Figure 5.3. Temporal changes in composition of photosynthetic pigments in resting spores under various light intensity condition. Resting spores of *Chaetoceros pseudocurvisetus* formed under nitrate deplete condition (Day 6).

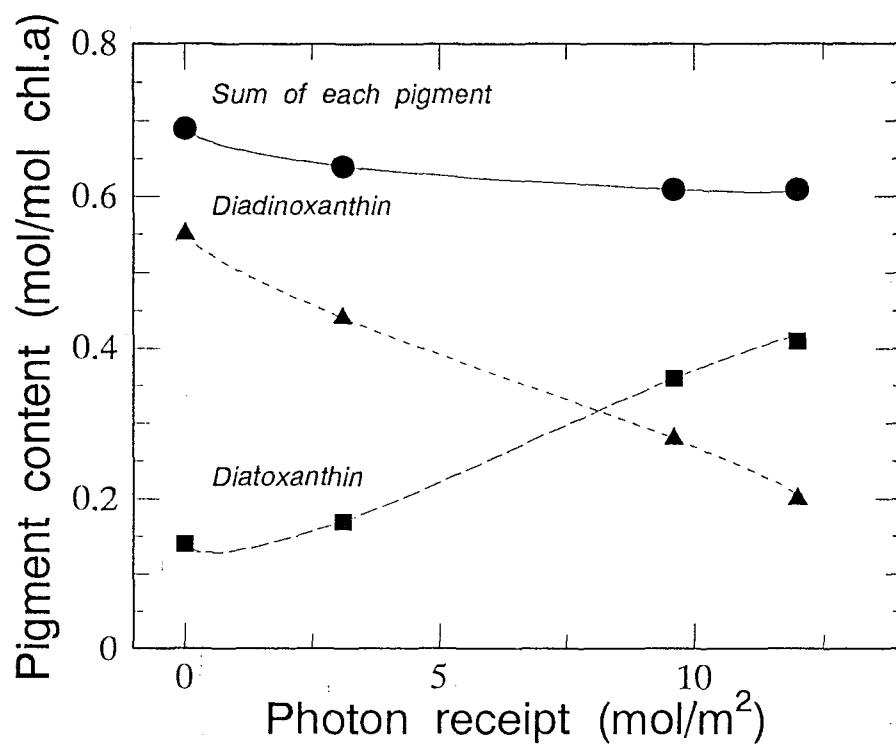


Figure 5. 4. Relationship between photon receipt of culture and contents of xanthophyll-cycle pigments (diadinoxanthin and diatoxanthin) and sum of them. Data are used in Fig. 5. 3.

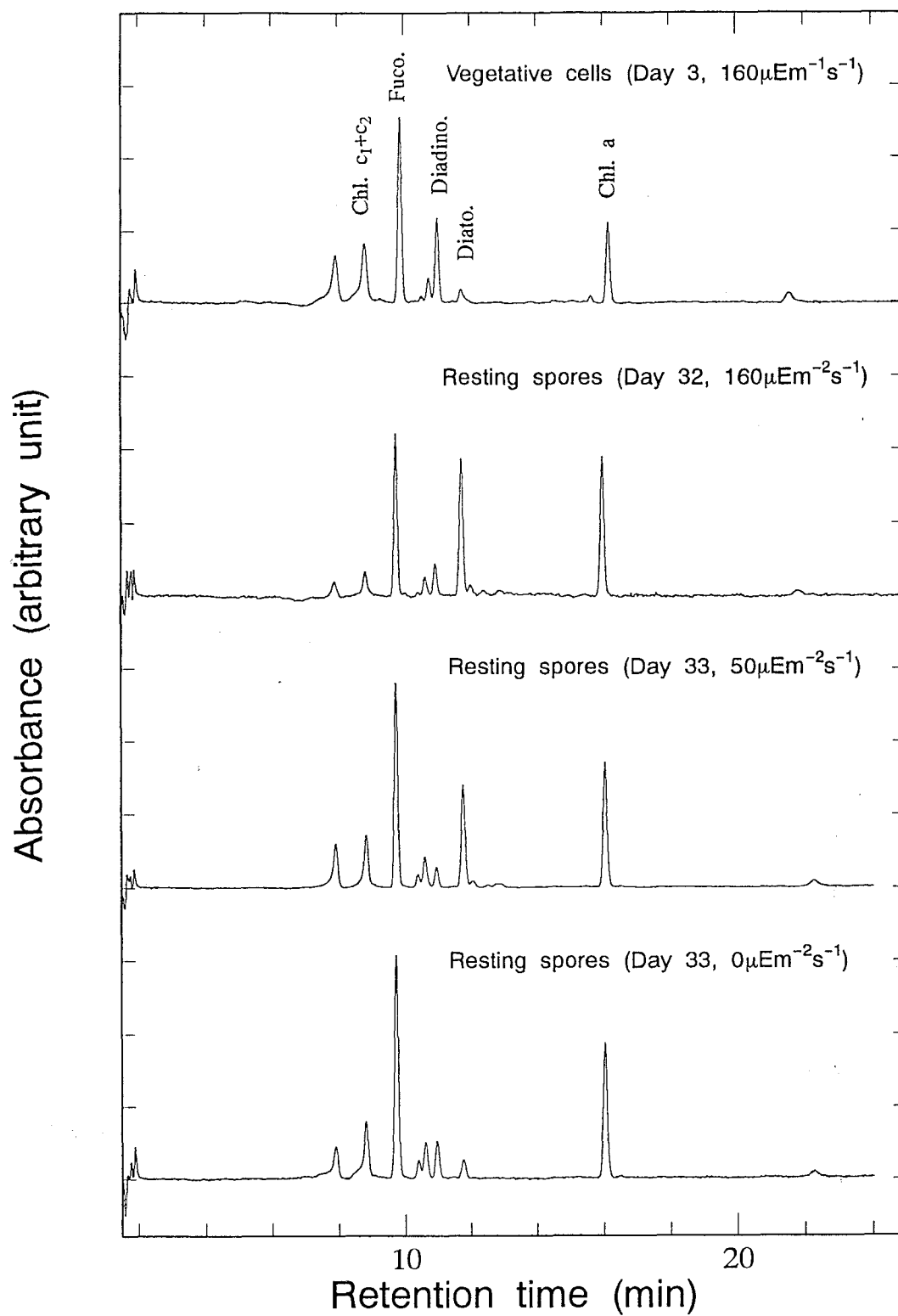


Figure 5. 5. Chromatograms of photosynthetic pigments in vegetative cells and resting spores under various light conditions.

Diatoxanthin のピークは高くなってゆく傾向のあることが Fig. 5.3 より明らかである。 $200 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度では、このような変化は光照射時間が2時間増しただけでも明瞭に現れた。しかし、他の光合成色素（Phacophorbide *a* 類似色素, Chl. *c*₁ + *c*₂, Chl. *a*, Fucoxanthin, β -carotene）には目立った組成変化は見られなかった。

明条件に10時間放置し、細胞内に Diatoxanthin が蓄積した休眠胞子を暗条件に15時間保持した後に光合成色素を定量したところ、Diatoxanthin は少量になり、一方、Diadinoxanthin 含量が増加していた（Fig. 5.3）。

クロマトグラムのデータから、Chl. *a* に対する Diadinoxanthin と Diatoxanthin のモル比を算出し、これらを積算光量子量に対してプロットした（Fig. 5.4）。Chl. *a* に対する Diadinoxanthin 比は積算受光量の増加に対して0.55から0.20まで減少していったが、逆に Diatoxanthin 比は0.14から0.41に増加した。しかし、両色素比の和は積算受光量の増加に対して0.69から0.61の範囲に収まっており、ほぼ一定していた。これらの結果から、休眠胞子の Xanthophyll cycle は一日の明暗周期と同調していることがわかった。

7) 光照射強度と色素組成

休眠胞子は海洋の表層から深層あるいは堆積物に至る幅広い光環境に存在することが知られている。そこで休眠胞子の光合成色素組成が光の強弱でどのように変化しているのかを測定した（Fig. 5.5）。休眠胞子はすべて採取日の光照射8-10時間の間に収穫した。

$160 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強光条件で33日培養した休眠胞子には、Diatoxanthin の高いピークがみられ、Xanthophyll cycle が活発に働いていることが分かった。同様の現象は $50 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ の比較的弱い光強度で33日間培養した休眠胞子にもみられたが、Diatoxanthin のピークは $160 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光条件下よりも低かった。これらとは対照的に、無光条件で33日間培養した休眠胞子では、Diatoxanthin のピークは勿論のことながら、Diadinoxanthin のピークも低下していた。以上のことから、Xanthophyll cycle は強光条件下では活発に働くが、無光条件では Xanthophyll cycle が働かないことに加えて、Xanthophyll cycle 色素のプールサイズも減少してゆくことが分かった。

8) 明条件における休眠孢子の生き残りと発芽

a) 休眠孢子と栄養欠乏細胞の生き残り特性

強光条件 ($160 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$) で栄養欠乏細胞と休眠孢子を約1ヶ月間培養し、生き残り特性を比較したところ、培養一ヶ月の時点で、窒素・珪酸制限培養系では、観察された細胞は全てサイトプラズムを保持しておらず、すでに死滅しているものと判断された (Fig. 5.6A)。一方、窒素制限培養系の休眠孢子の多くはサイトプラズムを保持しており、クロロプラストの着色も明瞭であったことから、まだ生存しているものと考えられた (Fig. 5.6B)。この休眠孢子のクロロプラストは著しく凝集しており、細胞内の縁に位置する傾向が認められた。

b) Xanthophyll cycle の存在の有無

前述の休眠孢子で Xanthophyll cycle が働いているかどうかを調べるために、培養32日目に光合成色素組成を測定した (Fig. 5.7)。収穫時の光条件は明条件に10時間保持したものである。その結果、Diatoxanthin の高いピークと、Diadinoxanthin の低いピークが確認された。このことから、休眠孢子中の Xanthophyll cycle が依然として機能していることが窺えた。そこでこの休眠孢子を24時間暗条件に保持した後に色素組成を分析したところ、Diadinoxanthin の増加とそれに伴う Diatoxanthin の減少が見られた。したがって、形成後に長期間を経過した休眠孢子でも Xanthophyll cycle は一日の明暗周期に連動して働いていることが分かった。

c) 発芽特性

休眠孢子・栄養欠乏細胞が発芽あるいは増殖できるかどうかを確認するために、それぞれの培養系から珪藻細胞を含む沈殿物を個別に栄養過剰な f/10 培養液に接種し、温度 20°C , 14L:10D, $200 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で培養し、*in vivo* 蛍光の経日変化を追跡した。その結果、窒素制限培養系の沈殿物からは休眠孢子の発芽に伴う栄養細胞の出現と、それに続く栄養増殖が観察されたが、窒素・珪酸制限培養系の沈殿物からは、珪藻細胞の増殖は全く見られなかった (Fig. 5.8)。

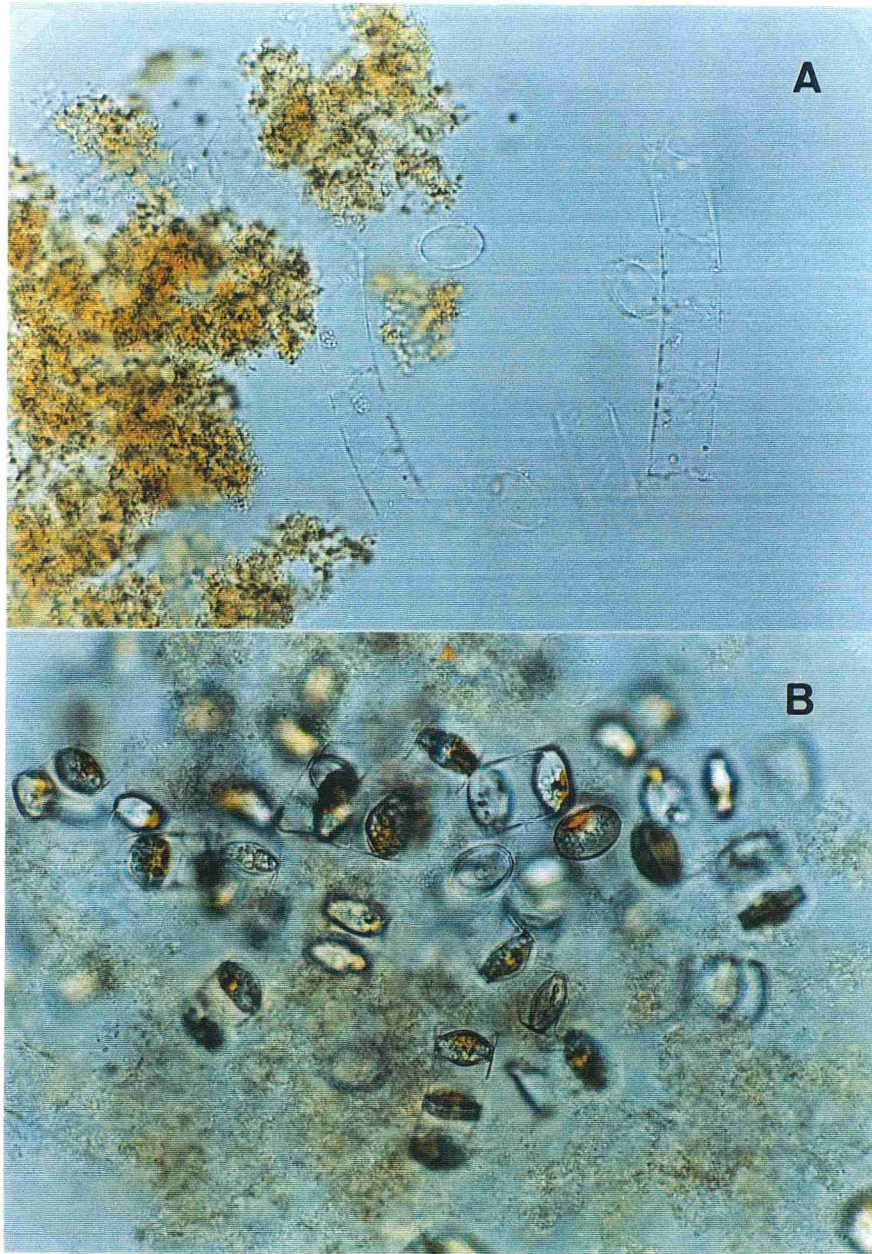


Figure 5. 6. Light micrographs of (A) empty nutrient starved cells in nitrogen and silicic acid depleted culture, and (B) surviving resting spores in nitrogen depleted culture under high light intensity ($160\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, 14:10 LD cycle, Day 37).

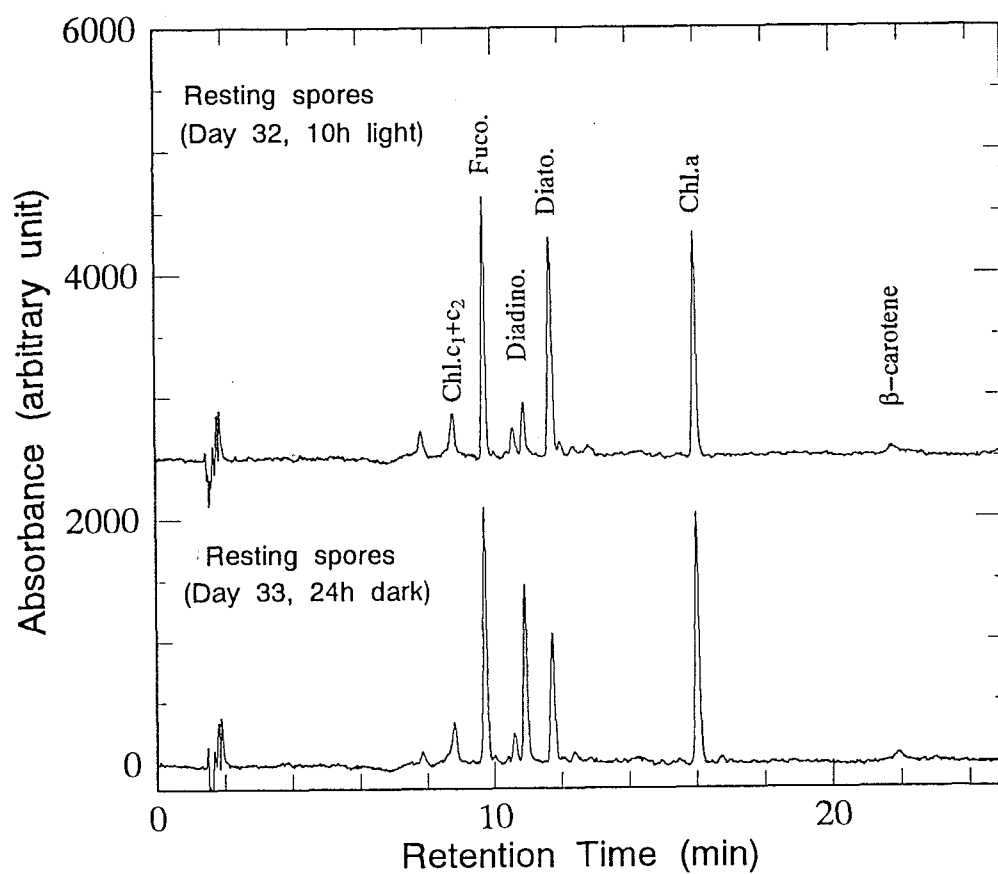


Figure 5. 7. Chromatograms of photosynthetic pigments extracted from *Chaetoceros pseudocurvisetus* resting spores after 1 month of their formation.

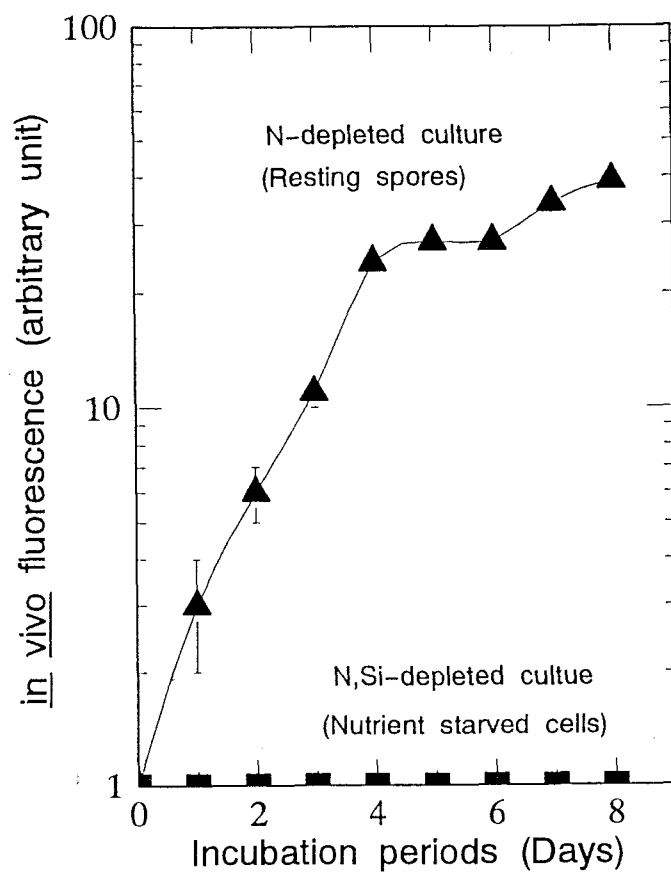


Figure 5. 8. Germination of resting spore (Day 49) after inoculated into fresh culture media (nutrient replete, f/10 level of metal mixture and vitamin). No growth was observed in the culture inoculated from nitrogen and silicic acid depleted culture (cf. Fig. 5. 6.).

このことから、休眠孢子は強光条件下で長期間培養しても生存可能であり、しかもすばやく発芽することが分かった。

5. 4 考察

1) 孢子形成に伴う単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光の変化
一般的な理論によれば、活発に光合成を行っている植物では、光化学系Ⅱの反応中心付近に位置する電子受容体（プラストキノンQ）の還元と再酸化が滞りなく行われ、光エネルギーが化学的還元エネルギーに効率よく変換される。このとき、吸収された光エネルギーの蛍光放散や熱としての損失は少ない。ところが何らかの理由でプラストキノンQの再酸化が妨げられると、反応中心付近で励起クロロフィルから生じた電子の受容体がなくなるため、光吸収により生じた還元エネルギーの一部は蛍光となって細胞外へ放射される。このことから単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光の増加は、光合成活性の低下の指標となる（石丸・藤田 1985, 西村 1987, 古谷 1996）。

Ch. pseudocurvisetus の単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光は栄養欠乏細胞で増加していたことから、光合成活性の低下が栄養制限により引き起こされることが窺える（Table 5.3）。休眠孢子では単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光の増加はさらに著しいことから、休眠孢子の光合成活性は非常に低下しているといえる。このことは光エネルギーの固定と以後に続くATP生産、炭素固定などの一連の代謝過程が抑制されていることをも示唆する。

栄養欠乏下で細胞に光エネルギーがもたらされることは、細胞内への過剰なエネルギー供給を意味する。過剰な光エネルギーは細胞内器官の光化学的損傷を引き起こすので（Belay and Fogg 1978, Powles 1984），何らかの形で消費または放出することが生き残り上重要であると考えられる。休眠孢子における単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光の大幅な増加は、過剰なエネルギーが蛍光により分散されていることを示しており、細胞内への還元エネルギーの蓄積を防ぐ機能としても働いていると推測される。

2) 珪藻における Xanthophyll cycle

Xanthophyll cycle とは、明条件下ではエポキシ化 Xanthophyll の脱エポキシ化が起こり、暗条件下ではエポキシフリー Xanthophyll のエポキシ化が起こる一連の過程のことである (Fig. 5.9)。Hagar (1975) によれば、Xanthophyll cycle は NADPH, デヒドロアスコルビン酸, グルタチオン還元酵素が関与したエネルギー消費的な過程であり、epoxytase と de-epoxytase の働きにより可逆的に進行する (Fig. 5.9C)。しかしその詳細が明らかになっているわけではない。

Xanthophyll cycle は、陸上植物ではアンセラキサンチンやビオラキサンチンからゼアキサンチンが生成する反応として (Hagar 1975, Demmig-Adams et al. 1989, Thayer and Bjorkman 1990), また珪藻・鞭毛藻などの微細藻類では Diadinoxanthin から Diatoxanthin が生成する反応として知られている (Hagar 1975,

Cunningham and Schiff 1986, Demers et al. 1991)。Xanthophyll cycle が機能している植物では、Xanthophyll cycle 色素に占めるエポキシフリーの色素の割合が増加するにつれて、光合成活性が落ちてゆくことが知られており (Thayer and Bjorkman 1990), また, *in vivo* クロロフィル蛍光の急激な消光 (quenching) が起こる場合のあることも知られている (Demers et al. 1991)。この蛍光の消光の機構を調べた最近の研究によれば、Xanthophyll cycle は non-radiative なエネルギー分散により、細胞内の過剰なエネルギーを逃がすための働きを持つと考えられている (Demmig et al. 1987, Demmig-Adams et al. 1989)。

カロチンや Xanthophyll は光捕集性色素としての役割に加えて、励起クロロフィルのエネルギーを消去したり、細胞内の一重項酸素やヒドロキシラジカルを消去する機能をもっており (Hagar 1975, 西村 1987, Krause 1988), 細胞内の光損傷を防ぐ保護物質としても働いていることが知られている (Fig. 5.9B)。

これらのことから総合的に判断すれば、Xanthophyll cycle は植物が強光に曝されたときの細胞内の損傷を防ぐための、過剰エネルギーの分散/無害化機能であるといえよう。

珪藻における Xanthophyll cycle の研究は *Thalassiosira oceanica*, *T. pseudonana*, *T. weissflogii*, *Phaeodactylum tricornutum* などと報告があり、後3種では Xanthophyll cycle の存在が指摘されている (Sakshaug et al. 1987, Demers et al. 1991, Geider et al. 1993, Latasa 1995)。これらの珪藻の Xanthophyll cycle 色素

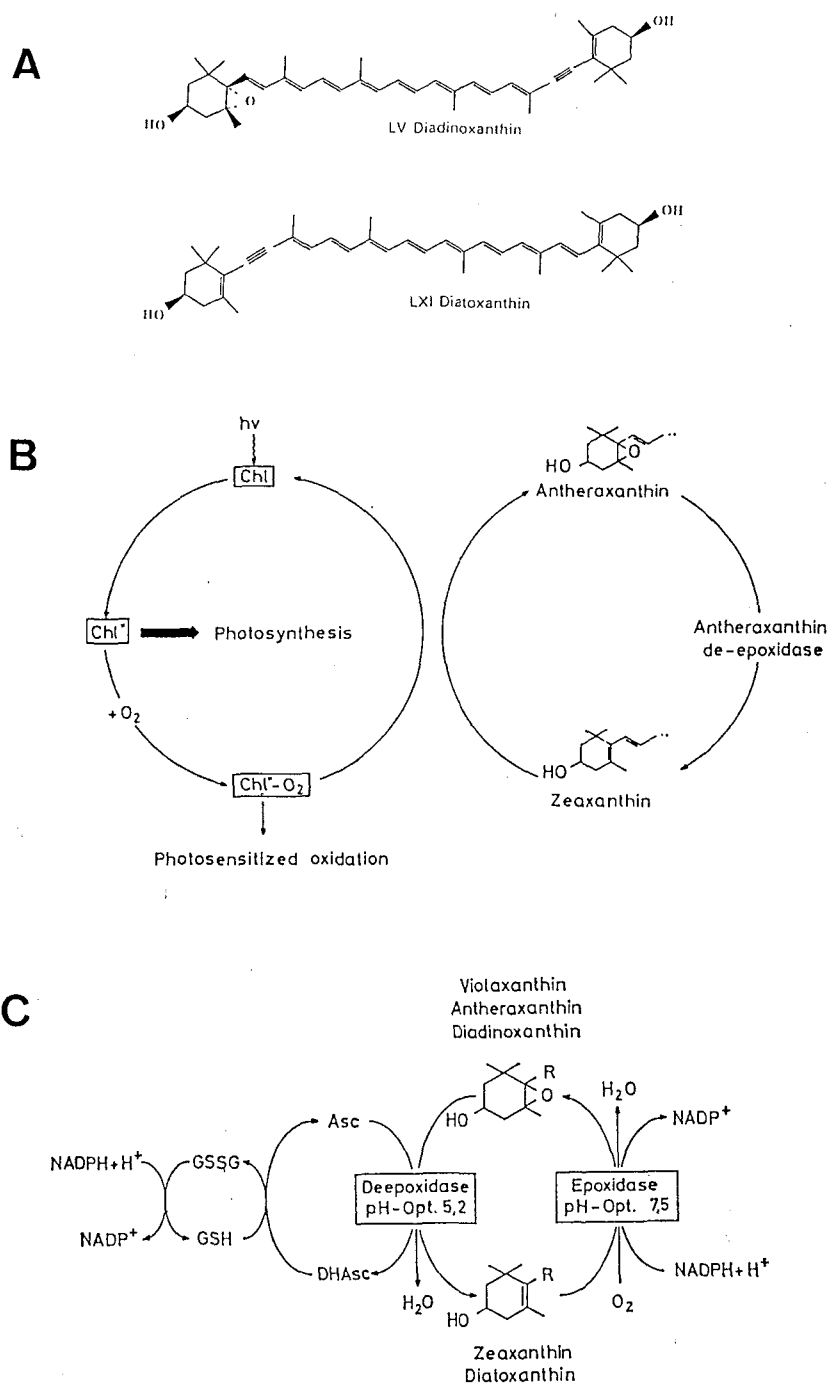


Figure 5.9. Possible role of xanthophyll cycle. (A) Chemical structure of xanthophyll-cycle pigments; (B) singlet oxygen consumed process; (C) reduction energy consuming process. (after Hager 1975)

は対数増殖期よりも定常期に多くなる傾向、及び、窒素やリン酸の枯渇に伴ってクロロフィルに対する存在比が増すことが知られている (Geider et al. 1993, Latasa 1995)。また、光強度が増すと Xanthophyll cycle 色素が増加することも見いだされている (Latasa 1995)。しかしこれらの研究例はすべて栄養細胞の分析により得られた結果であり、休眠胞子について Xanthophyll cycle の存在を明らかにしたのは本研究が初めてである (Fig. 5.1, 5.5)。休眠胞子の Xanthophyll cycle の特徴は次のように要約される。

- a) 明条件では、休眠胞子形成に伴い単位クロロフィル当たりのキサントフィルサイクル色素のプールサイズが大きくなる
- b) 明条件におけるエポキシフリー色素の割合が栄養細胞に比べて高い
- c) 低光量 ($50 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$) でもエポキシフリー色素の生成が起こる
- d) 暗条件では単位クロロフィル当たりの Xanthophyll cycle 色素のプールサイズの減少が起こる
- e) 明条件、暗条件のどちらの休眠胞子でも単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光強度に大きな変化は認められない

単位クロロフィル当たりの Xanthophyll cycle 色素のプールサイズが暗条件では小さく (d)、明条件で大きい (a) ことは、明条件では休眠胞子中で Xanthophyll cycle 色素が合成され、暗条件ではこれらが分解・消失することを表している。さらに、Xanthophyll cycle 色素に占めるエポキシフリー色素の割合の増加 (b) と、その現象が栄養細胞よりも低光量で観察されること (c) から窺えるように、Xanthophyll cycle は栄養細胞よりも休眠胞子で活発に働いているといえる。これらのことから、休眠胞子の Xanthophyll cycle の活性は光環境条件の変動に合致するように柔軟に変化するものと考えられる。休眠胞子は強光条件である表層水から (Odate and Maita 1990)、弱光または光が届かない海底堆積物上 (Garrison 1981, Pitcher 1986, 奥・鎌谷 未発表) までの様々な光環境から見いだされているので、Xanthophyll cycle のこのような特性は、光エネルギーから細胞を保護するのに効果的に働き、休眠胞子の生き残りに重要な働きをしていると思われる。

単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光値は明条件、暗条件のどちらに置かれた休眠胞子でもほぼ同じ値を示し (e)、Diatoxanthin の蓄積に伴う蛍光の急激な消光 (quenching) は見られなかった (Table 5.2, 5.3)。このこ

とは栄養欠乏細胞でも同じであった。したがって、休眠孢子の Xanthophyll cycle は、鞭毛藻や陸上植物で報告されているような、エポキシフリー色素の生成に伴って急激な蛍光の消光が起こるタイプ (Demmig et al. 1987, Demmig-Adams et al. 1989, Demers et al. 1991) とは異なっている。エポキシフリー色素の生成に伴って蛍光の消光が起こる場合は、吸収されたエネルギーの過剰分が non-radiative なエネルギー分散機構により細胞外へ放出されることが示唆されている (Demmig-Adams et al. 1989, Demers et al. 1991)。しかし、すでに述べたように *Ch. pseudocurvisetus* の休眠孢子では単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光の大幅な増加が起こっていることから、過剰エネルギーの分散は radiative な機構 (蛍光放射) によると考えられ、この点でも蛍光消光型の Xanthophyll cycle との違いが際立っている。このような蛍光の消光を伴わないタイプのエポキシフリー色素の蓄積現象は、珪藻 *Thalassiosira weissflogii*, *Phaeodactylum tricornutum* で知られているが (Latasa 1995, Geider et al. 1993), この現象の機構の詳細は明らかではない。これはチラコイド膜のルーメンにおいて過剰な電子の蓄積が起こったことによる受動的な反応であろうとの推測もあるが (Latasa and Berdalet 1994, Latasa 1995), もしそうならば、エポキシフリー色素の蓄積は過剰な電子の還元エネルギーの消去機構として働いていると解釈できるので (Hagar 1975), 細胞の還元エネルギーによる破壊を防ぐ役割を持つという結論には変わりがない。

いずれにせよ、本研究の結果のみでは *Ch. pseudocurvisetus* の休眠孢子の Xanthophyll cycle がどのような機構により起こっているのかを判断するのは難しい。しかし、単位クロロフィル当たりの Xanthophyll cycle 色素の増加は、クロロフィルに吸収される励起帯の波長の光量の減少を意味し、また同時に、一重項酸素の消去やクロロフィルの励起エネルギーの受容体としての機能の強化につながる。光化学系を過剰エネルギーから守り、細胞の光破壊を効果的に防いでいると推論することは妥当であると思われる。この機能と、過剰エネルギーの蛍光による分散機構、並びにクロロプラストの凝集・縮小を組み合わせることで、休眠孢子の光化学系は効果的に保護されているのかも知れない。

3) 細胞内ヌクレオチド組成

a) ATP, ADP, AMP

植物プランクトンの栄養細胞と休眠期細胞の ATP や主要なヌクレオチドの含量を測定・比較した研究は非常に少なく、特に珪藻の休眠孢子と栄養細胞でのこれらの成分を測定・比較したのは本研究が初めてである。

AMP, ADP, ATP は主要なエネルギー代謝ヌクレオチドであるので (Marschner 1986), 休眠孢子中の単位クロロフィル当たりの AMP, ADP, ATP 量が栄養細胞や栄養欠乏細胞に比べて著しく低下していることは、休眠孢子中の細胞内のエネルギー供給能の抑制を示していると考えられる。植物の主要なエネルギー獲得形式としては呼吸と光合成が挙げられるが、一般に休眠孢子の暗呼吸活性は栄養細胞よりも低下していることが知られているので (French and Hargraves 1980, Kuwata et al. 1993), 呼吸による ATP 生産は少ないと考えられる。したがって、休眠孢子中の単位クロロフィル当たりのアデニンヌクレオチド量の減少は、呼吸によるエネルギー生産能の低下とあいまった、光合成活性の抑制によりもたらされていると思われる。休眠孢子中の単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光の増加はこのことを支持するデータのの一つである。

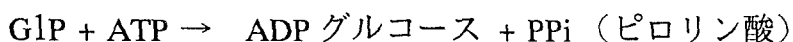
一方、栄養欠乏細胞の単位クロロフィル当たりのアデニンヌクレオチド量は栄養細胞の81%とほぼ同じであることから、この細胞は休眠孢子よりも高い光合成活性を維持しているものと思われる。このことは単位クロロフィルあたりの *in vivo* 蛍光が休眠孢子の値の半分以下にとどまっていることから窺える。

休眠孢子中のヌクレオチド含量 (測定したヌクレオチドの総量) は栄養細胞 (栄養過剰培養系) の28%と大幅に減少しており、細胞内の代謝活性が総合的に低下していることを裏付けている。植物プランクトンの休眠期細胞の形成に伴う細胞内の代謝活性の低下は鞭毛藻で知られており、*Scrippsiella trochoidea* では細胞当たりの ATP 含量が低温、暗条件に置かれたシスト中で低下することから、シスト中の一般的な代謝活性の低下が起こっていると推測されている (Lirdwitayaprasit et al. 1990)。また、*S. trochoidea* はシスト形成に伴い呼吸速度と光合成活性が著しく低下することも知られており (Binder and Anderson 1990), これらの報告は本研究の結果とよく一致している。したがって、休眠孢子は鞭毛藻のシストのように、各種の代謝活性が著しく低下したステージである

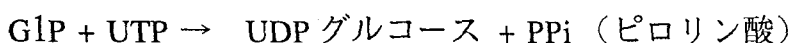
と判断される。

b)ADPG

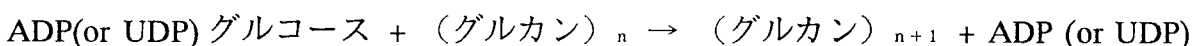
栄養細胞（栄養過剰培養系），栄養欠乏細胞，休眠胞子の中で細胞当たりの含量の変化が最も大きかったのはADPGである。ADPGはATP とG1P（グルコース6リン酸）からADP グルコースピロホスホリラーゼ反応（ADPP 反応）を介して合成される（例えば Gander 1976）。ここで生じたADPGはグルカンへのグルコース供与体となる。UDPGについても類似の反応が知られている。（グルカンの合成にどの糖ヌクレオチドが使われるかは，生物種と生じるグルカンの種類とにより様々である）。



（ADP グルコースピロホスホリラーゼ）(ADPP)



（UDP グルコースピロホスホリラーゼ）(UDPP)



この反応式から類推すると，炭水化物代謝が滞りなく回転しているときにはADPG，UDPG 含量は細胞内であるレベルで存在していると思われる。代謝が阻害を受け光合成がシンクリミットになるとこれらの糖ヌクレオチド濃度は増加することが知られている。例えば，*Glycine max* を連続明条件に置くことにより暗反応を阻害すると，糖ヌクレオチドの蓄積が起こることが見いだされているが，この現象は最終産物阻害による効果であると解釈されている（Sawada et al. 1989, 葛西・沢田 1995）。

栄養細胞が栄養欠乏環境下に曝されて栄養欠乏細胞になると，ADPG の過剰蓄積が起こる（Table 5.4）。栄養欠乏細胞は珪酸・硝酸塩の枯渇によりすでに増殖（分裂）できない細胞である。この細胞のADPG 含量が多いことは，少なくとも以下の3 つの条件が満たされている必要がある；第一に，明反応は活発であり，ATP の細胞内への供給が可能であったこと。第二に，細胞内へのグルカ

ンの蓄積により、新たなグルカン鎖の伸長反応に負のフィードバックがもたらされたこと。第三に外部との物質のやりとりができること。

すでに5.4 3) a) で述べたように第一の条件は満たされていると考えられる。*Ch. pseudocurvisetus* は窒素・珪酸欠乏条件で細胞分裂が阻害され、同時にグルカンの蓄積が起こることが知られていることから (Kuwata et al. 1993), 第二の条件についても十分に起こり得るものと思われる。栄養欠乏細胞は窒素や珪酸の枯渇後でもリン酸を吸収していることから、三番目の条件も満たしている。これらのことから、栄養欠乏細胞は、窒素・珪酸の枯渇により細胞分裂が停止しているものの、細胞内部の光合成活性は高く保たれ、結果として生じた光合成産物により最終産物阻害 (end product inhibition) が起こっている状態にあると見なすのが妥当であると思われる。

一方、休眠胞子の ADPG 含量は少ない。休眠胞子も分裂しない細胞であるので、シンクリミットによる最終産物阻害は栄養欠乏細胞と同様に起きやすいものと考えられる。そこで上の三条件に照らしてみると、1) 休眠胞子の光合成活性は栄養欠乏細胞よりも活発ではない、2) 細胞内には多量のグルカンの蓄積が見られ (Kuwata et al. 1993), 新たなグルカン鎖の伸長反応に負のフィードバックがもたらされる可能性はある、3) 栄養塩から見る限り、外部との物質のやりとりは見られない、との結果になり、1) と3) が条件を満たしていない。したがって、休眠胞子中で ADPG の含量が少ないのは、この細胞の光合成活性が低下しており (cf. 5.4 3) a)), ソースリミットになっていることが原因であると判断するのが合理的と思われる。

これらのことから、休眠胞子内部で起こっている ADPG の関与した代謝系の変化は、単に窒素欠乏によりもたらされる受動的なものではなく、休眠胞子形成に伴う積極的变化であると推測できる。つまり、休眠胞子形成に伴う代謝変化は、窒素欠乏により引き起こされる代謝変化の延長線上にあるものではなく、休眠胞子形成に独自の特殊なものであるといえる。

休眠胞子の光合成がシンクリミットになっていることは、過剰なエネルギーや物質の蓄積による細胞の破壊が起こりにくいことを意味しており、明条件下での光に対する耐久性の確保という点でも合理的であると考えられる。

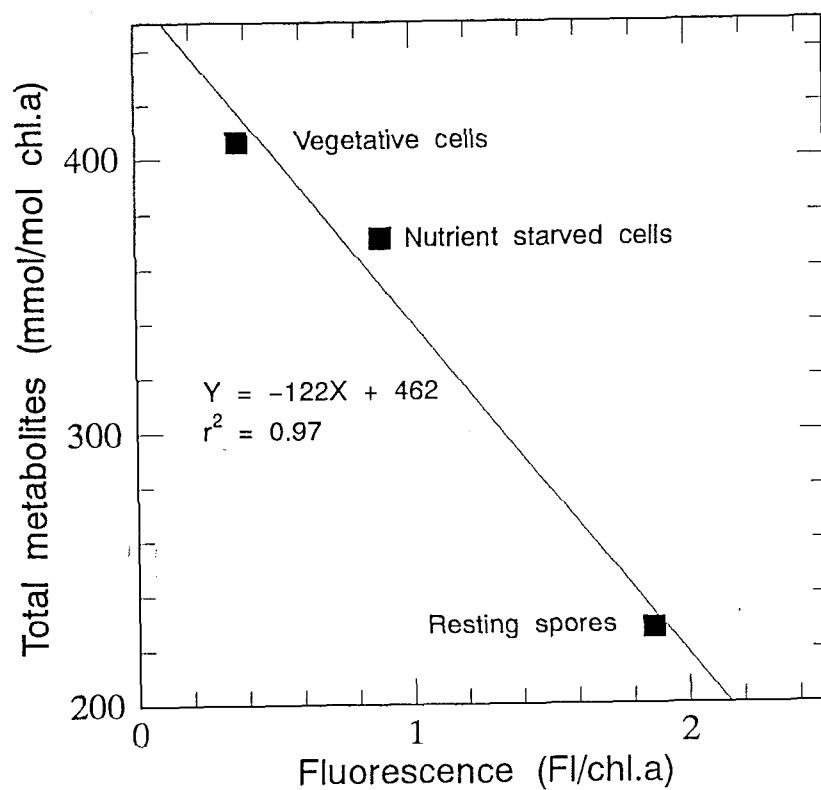


Figure 5. 10. Relationship between *in vivo* fluorescence and total metabolites. Each cell are same in Fig. 5. 2.

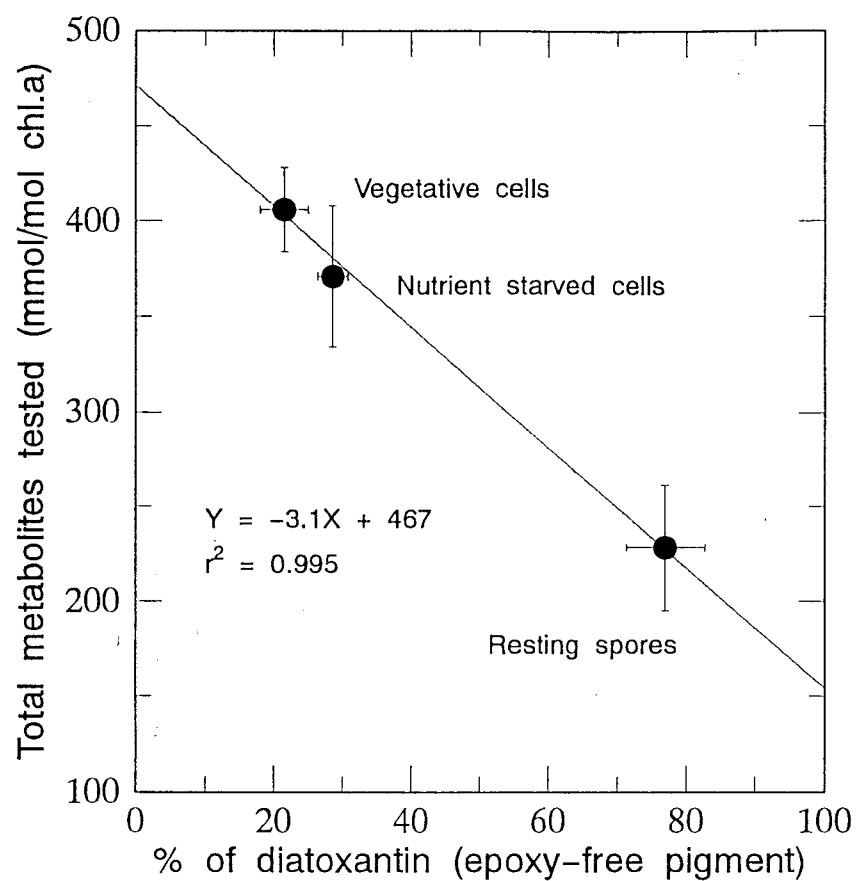


Figure 5. 11. Relationship between total metabolites and percentages of diatoxanthin for xanthophyll-cycle pigments. Each cell are same in Fig. 5.2.

4) クロロフィル当たりの *in vivo* 蛍光, Xanthophyll 色素組成, ヌクレオチド含量の関連

単位クロロフィル当たりの *in vivo* 蛍光と単位クロロフィル当たりのヌクレオチド量の合計を各細胞についてプロットしたところ、両者の間には強い負の直線関係が見られた (Fig. 5. 10)。即ち、単位クロロフィル当たりの *in vivo* 蛍光の最も強い休眠孢子で、最もヌクレオチド含量が少ないという結果になった。同様にして、Xanthophyll cycle 色素に占める Diatoxanthin の割合と、測定したヌクレオチドの総和を Fig. 5. 11に示した。データポイントは少ないものの、Diatoxanthin の割合は、単位クロロフィル当たりのヌクレオチド量と非常によい相関を示した。これらのことから、Xanthophyll cycle の活発さ、すなわち、エポキシフリー色素の増加の度合、単位クロロフィル当たりの *in vivo* 蛍光、細胞内ヌクレオチド濃度の3者の間には密接な相互関係があるものと思われる。即ち、休眠孢子に入射した過剰な光エネルギーの大部分は蛍光により放散され、光合成活性が大きく低下している。また、細胞内の過剰な還元エネルギーを、Diadinoxanthin の脱エポキシ化過程に消費することにより、細胞内の過剰エネルギーや活性酸素による損傷は起きにくい状態になっているものと考えられる。これらの諸過程により休眠孢子的光合成活性は明条件でも低い状態にあり、各種ヌクレオチドの合成・代謝も不活発になっており、光に対する抵抗力が強まっているものと推測される。

5) 高温・明条件における耐久性の獲得

休眠孢子は厚い珪酸の被殻を持つことから、急速に海底に沈降するであろうと考えられている。そこで海底や有光層下部での生き残り機構の解析の観点から、これまでも低温・暗条件での休眠孢子的寿命が調べられてきた (Hargraves and French 1975, Durbin 1978, Marone and Chervin 1979, Hargraves and French 1983)。それらの報告によれば、珪藻の休眠孢子は暗条件下では温度が低いほど寿命が長いとされている。例えば *Thalassiosira nordenskioeldii* は0 °Cで576日の生き残りが確認されているが、15 °Cでは42日、20 °Cでは7日以下である (Durbin 1978)。

休眠孢子的寿命が低温で長いことは、細胞内の生化学反応の多くが酵素反応を

介しており、それらが温度依存性を持つことを考えると説明がつく。休眠胞子は細胞内に貯蔵性多糖を始めとした有機炭素を多量に含んでおり（French and Hargraves 1980, Kuwata et al. 1993）、この有機炭素は呼吸などのエネルギー代謝に用いられている（Handa 1969）。周囲の温度が低いと、これらの代謝活動に関連した生化学反応の速度が遅くなるので、結果として貯蔵炭水化物などのエネルギー源の消費が抑えられるため、休眠胞子の寿命が延びると考えられる。また、休眠胞子が暗条件でより長く生き残るのは、細胞内に過剰な還元エネルギー（光エネルギー）がもたらされることがないからだと考えられる。

一方、高温・明条件で長期間生き残る休眠胞子の存在を報告した研究例は見当たらない。栄養欠乏下で細胞に光エネルギーがもたらされることは、細胞内に過剰なエネルギーが供給されることに他ならず、光合成器官の光損傷（Belay and Fogg 1978）や光合成の光阻害（Powles 1984）が引き起こされる可能性が増す。海産珪藻が窒素制限に曝されると、光阻害を起こす紫外線のレベルが下がることも知られている（Cullen and Lesser 1991）。高温条件であれば、生体内の酵素反応の多くは低温条件よりも早くなり、細胞のエネルギー消費も大きくなることが予想される。したがって栄養欠乏・明条件・高温というような環境条件は珪藻の生き残りにとって極めて過酷な場であるといえよう。栄養欠乏により形成する休眠胞子がこのような環境条件に適応可能であれば、胞子形成は種の生き残り戦略に有効な機能を果たすことが考えられる。

Ch. pseudocurvisetus の休眠胞子は 20°C , 14L:10D, $160\mu\text{Em}^{-2}\text{S}^{-1}$ という栄養欠乏・高温・強光条件で7週間を経てもなお発芽能を備えていた（Fig. 5.8）。一方、栄養欠乏細胞はこの条件で速やかに死滅した。このことから、*Ch. pseudocurvisetus* の休眠胞子が栄養欠乏・高温・明条件という過酷な環境に対する耐久性を持っていることは明らかである。また、この生き残り特性はこの珪藻の休眠胞子が夏眠細胞としても機能することを示唆しており、このような報告が見当たらないことから、現場水域での休眠胞子の役割を考える上でも注目に値する。このような各種環境への適応能力は、

- 1) 細胞当たりのクロロフィル量の減少
- 2) 単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光の増加
- 3) これらに伴う細胞当たりのヌクレオチド量の低下

4) Xanthophyll cycle による光化学系の光破壊からの保護

5) クロロプラストの著しい凝集

というような孢子形成に伴う各種の代謝変化が複合的に組み合わさることにより生み出されたものであると考えられ、これら諸過程の変化により休眠孢子の光合成活性は低く保たれ、栄養枯渇環境下での寿命と光に対する耐久性が確保されているものと思われる。

以上のように、*Ch. pseudocurvisetus* の休眠孢子は、栄養細胞とも栄養欠乏細胞とも生理的に全く異なる、厳しい環境条件下で生き残るための特殊な細胞であることが示された。これら休眠孢子の生理的性質は海洋環境での種の生き残りという観点から見て合理的であり、休眠孢子形成がこの珪藻種の個体群の維持機構として重要であることの証拠といえる。

5. 5 まとめ

休眠胞子の生理的特異性を明らかにするために、光合成色素とヌクレオチド組成の栄養細胞・栄養欠乏細胞との比較を試みたところ、以下の結果が得られた。

- 1 休眠胞子・栄養欠乏細胞には明らかな Xanthophyll cycle が存在した。
- 2 休眠胞子形成に伴い、Chl. *a* 含量は減少し、単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光は増加した。
- 3 細胞当たりのヌクレオチド含量は栄養細胞で最も多く、以下栄養欠乏細胞、休眠胞子の順であった。
- 4 栄養細胞と比較すると、休眠胞子では全てのヌクレオチド濃度が低下していた。一方、栄養欠乏細胞では ADPG の過剰蓄積が認められた。
- 5 明暗周期を与えた条件で栄養欠乏細胞と休眠胞子を長期間培養したところ、^も休眠胞子は7 週間を経てもなお発芽能を保持していた。一方、栄養欠乏細胞はこの期間ですべて死滅した。

第6章 まとめと展望

6. 1 本研究の展開と主要な成果

1) 研究の背景と目的（第1章）

本論文では珪藻の休眠孢子に着目した一連の研究を展開してきた。第1章では海洋の基礎生産・物質輸送に果たす珪藻の役割と、これまでの休眠孢子的研究の経緯と問題点を整理した。そこでは、海洋の基礎生産・物質輸送において主要な役割を担っているのが珪藻であること、並びに珪藻の季節的消長に大きな影響を与えているのが休眠孢子形成という現象であることを示し、孢子形成の研究の重要性を指摘した。

そこで、過去の休眠孢子に関する研究について整理したところ、従来の研究は主に形態学的特徴や、水域における分布・季節的消長に関するものに偏っており、孢子形成を誘導する環境因子、休眠孢子的発芽因子や代謝物質の含量及び組成といった生理生化学的特徴に関係した知見が著しく欠けていることが分かった。

休眠という現象は、増殖に不適当な期間を乗り切り個体群を維持してゆくために、生育や代謝の活性を極端に低下させて環境条件に対する耐久性を獲得する過程であるから、代謝に関する知見が不足していることが、休眠孢子的生態学的役割に不明な点が多い原因であると考えられる。このような経緯から、休眠孢子的代謝物質含量・組成に関する知見を得ることが最も重要な研究課題の一つであるとの認識に到達した。

この目的のために、1) 休眠孢子的を純粋に得られるような珪藻を選別し、2) この珪藻に対して代謝物質の分析法を確立し、3) 栄養細胞と休眠孢子的の代謝物質組成を調べる、という順序で作業を進めた。

2) 休眠孢子形成種の探索（第2章）

休眠孢子和栄養細胞の代謝物質組成の比較検討のためには休眠孢子和栄養細胞をできるだけ純粋に得ることが重要である。そこで第2章では、培養しやすく、かつ休眠孢子和を形成しやすい珪藻種を明らかにすることを試みた。

世界の海洋に普通に見られ、量的にも多い珪藻の最重要種群である

Chaetoceros 属を対象と定め、相模湾表層水から11種を分離した。これらの種の維持培養を半年にわたって続けたところ、安定して活発に増殖する種と、そうでない種が存在することがわかった (Table 2.1)。また、休眠孢子形成特性を栄養欠乏条件に着目して調べたところ、種間で孢子形成率に大きな違いのあることが明らかになった (Table 2.2)。このような種の増殖・孢子形成特性から総合的に見て、*Chaetoceros pseudocurvisetus* が維持しやすく、且つ孢子を形成しやすい実験に最も適している種と判断した。

また、この実験の過程で、窒素欠乏では孢子形成が見られなかったにも拘わらず、高塩分と窒素欠乏の条件では休眠孢子を形成する珪藻、*Chaetoceros anastomosans* の存在が明らかになった (Fig. 2.4~2.6)。これは珪藻の環境への適応能力の広いことを示す興味深い結果といえる。

3) 珪藻細胞中の光合成色素とヌクレオチドの分析法の確立 (第3章)

生体内の代謝物質の正確な分析を行うためには、対象とする生物と定量する物質に対して理想的な分析方法を確立することが望ましい。しかし、珪藻の光合成色素とヌクレオチドを正確でしかも迅速・簡便に測定できる方法は知られていない。そこで第3章では前章で選定した珪藻 *Ch. pseudocurvisetus* を試料として、光合成色素とヌクレオチド類の分析法の確立を試みた。

分析法は HPLC を利用したものとし、色素については抽出条件および HPLC の溶出条件、ヌクレオチドについては抽出試料の中和法と HPLC の溶出条件について幅広く検討を加えた。また、試料の分解を防ぎ、迅速に測定できるように分析システムを構築するようにした。

その結果、光合成色素はアセトン抽出-逆相クロマト法 (可視吸収検出) により、また、ヌクレオチドはトリクロロ酢酸抽出-第3アミン中和-逆相イオンペーアクロマト法 (紫外吸収検出) といった操作・方法の組み合わせにより、簡便な操作で迅速に分析できる方法が確立された (Fig. 3.2~3.4)。この方法の確立によって、珪藻の主要な光合成色素8種 (Chl. *a*, Chl. *c*₁ + *c*₂, fucoxanthin, *cis*-fucoxanthin, diadinoxanthin, diatoxanthin, β -carotene, phaeophorbide *a*-like) と、ヌクレオチド (AMP, ADP, ADPG, ATP, UDP, UDPG, UTP) を分離・定量が可能になった。

4) 休眠孢子形成に伴う細胞内リン組成の変化（第4章）

代謝の変化の概要をつかむには、各種の代謝に利用され、多くの情報を得ることができる成分に着目する必要がある。そこで、含量も多く生体内の様々な代謝に利用されているリン成分に着目して研究を行った（第4章）。

栄養過剰、窒素欠乏、リン欠乏の栄養条件を設定して培養実験を行い、休眠孢子形成過程を観察するとともに、細胞内リン組成を分画のレベルで比較した。その結果、休眠孢子的形成に関して、a) 十分量の珪酸が存在すれば、どの培養条件でも休眠孢子形成が見られる（Fig. 4.3）、b) 休眠孢子的形成には約 3 pmol/cell の付加的な珪酸を要求する（Fig. 4.6）、ということが分かった。

また、細胞内リン組成について、c) オルトリン酸と核酸態リンはどの細胞でも含量が多い、d) オルトリン酸とポリリン酸含量はリン欠乏条件下で減少する、e) 休眠孢子形成に伴い、糖リン酸とヌクレオチドの細胞内含量は低下する、という傾向があることがわかった（Table 4.1）。

糖リン酸とヌクレオチドは光合成や呼吸過程の主要な中間代謝産物であるから、細胞内の代謝活性の指標となる。したがって、e) の結果は、休眠孢子的形成に伴って、光合成や呼吸過程のようなエネルギー代謝の活性が低下することを示唆しており、休眠孢子と栄養細胞が本質的に異なる代謝系を持つことの証拠と考えられた。

5) 休眠孢子的の光合成色素とヌクレオチド組成（第5章）

第4章の実験結果はリン分画のレベルから得られたものであり、代謝機構の変化に関する詳細な情報を与えるものではない。そこで第5章では、細胞内の光合成を始めとした各種の代謝の変化についてより詳細で具体的な知見を得るための実験を行った。

栄養過剰、窒素・珪酸制限、窒素制限培養系を設定することにより、それぞれの培養系から栄養細胞、栄養欠乏細胞、休眠孢子を得た。この試料の光合成色素とヌクレオチドの含量・組成を、第3章で確立した分析法を用いることにより測定した。併せて単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光、栄養塩吸収比、各細胞の形態・生き残り特性についても調べ、3種の細胞の間で比較した。

これら一連の実験により、休眠孢子の生理生化学的特徴の一端が、以下のように明らかになってきた。

- f) 休眠孢子・栄養欠乏細胞には明らかな Xanthophyll cycle が存在した。
- g) 休眠孢子形成に伴い、Chl. *a* 含量は減少する一方、単位クロロフィル当たりの *in vivo* クロロフィル蛍光は大きく増加した (Table 5.2, 5.3)。
- h) 細胞当たりの ATP 含量は栄養細胞で最も多く、以下栄養欠乏細胞、休眠孢子の順であった (Table 5.4)。
- i) 栄養細胞や栄養欠乏細胞と比較して、休眠孢子では全てのヌクレオチド濃度が低下していた。一方、栄養欠乏細胞では栄養細胞よりも ADPG の含量が増加していた (Table 5.4)。
- j) 栄養欠乏・強光条件で栄養欠乏細胞と休眠孢子の生き残りを比較したところ、休眠孢子は7 週間を経てもなお発芽能を保持していた。一方、栄養欠乏細胞はこの期間ですべて死滅した (Fig. 5.6, 5.8)。

以上の実験結果から、休眠孢子では光合成やエネルギー代謝が不活発であり、また、栄養欠乏・強光条件への耐久性が増加していることが示された。

6. 2 休眠孢子の生理生化学的性質

上述のような一連の研究の成果の主要な点を要約し、これまでに得られている知見を加えれば、休眠孢子の生理生化学的特徴は以下のようにまとめられる (Fig. 6.1)。

休眠孢子中の Chl. *a* 含量の減少、クロロプラストの凝縮、単位クロロフィル当たりの *in vivo* 蛍光の増加といった現象 (Table 5.2, 5.3, Fig. 5.6) は、細胞内への還元エネルギーの過剰供給の抑制の役割を果たしており、さらに、Xanthophyll cycle の存在 (Table 5.2, Fig. 5.3~5.5) は過剰な還元エネルギーに対する生理的防御機構であると考えられる。

暗呼吸は栄養細胞よりも休眠孢子で不活発であることはすでに知られているが (French and Hargraves 1980, Kuwata et al. 1993), 糖リン酸や各種のヌクレオチド含量は明条件でも減少していた (Table 4.1, 5.4) ことを考えると、休眠孢子の細胞内の代謝の活性は総合的に低下していると判断される。このことは貯蔵性炭水化物・脂質 (Kuwata et al. 1993) の消費の抑制につながるもので、寿命の

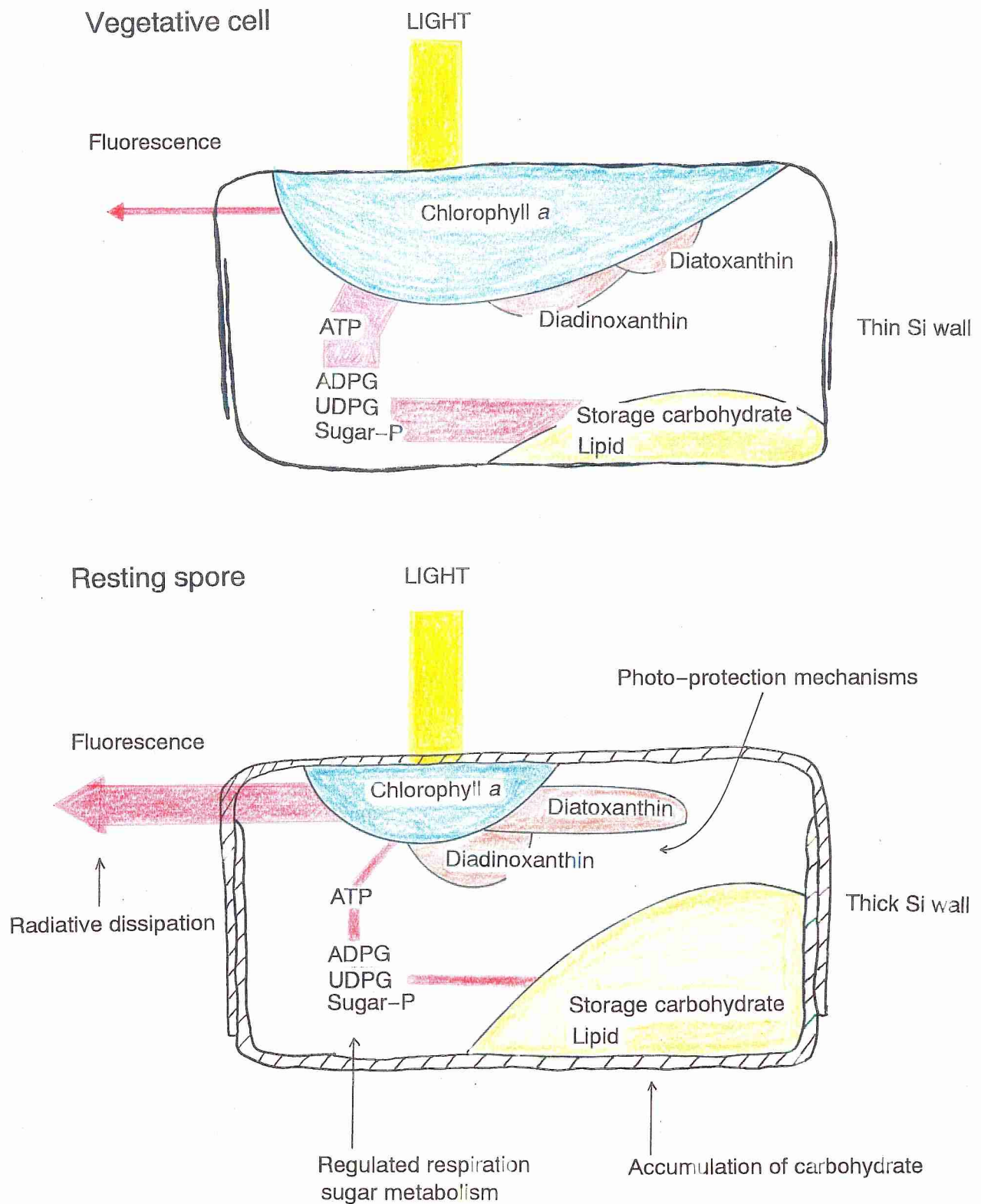


Figure 6. 1. Schematic representation of biochemical composition of vegetative cells and resting spores.

確保に重要な役割を果たす。

以上の代謝過程の変化により、休眠胞子は栄養欠乏・強光条件に対する耐久性を獲得しているとの結論に達した。

6. 2 仮説の再検討と今後の展望

1) 従来の仮説の見直し

これまでは、休眠胞子形成は栄養欠乏・強光という増殖に不適当な条件から逃避するための手段であるとの見方が強かった (Hargraves and French 1983)。また、休眠胞子は冬を越すための耐久細胞であるとの見方も強調されてきた (Gran 1912, Garrison 1984)。

しかし、*Ch. pseudocurvisetus* の休眠胞子が高温・強光条件にも強い耐久性を持ち、栄養条件の回復に伴いすばやく発芽・増殖することや、高塩分条件でも *Ch. anastomosans* が休眠胞子形成で生き残るという実験的事実は、休眠胞子の役割の多様さを示しており、上記の仮説の不十分さを表している。本研究の成果から考えれば、休眠胞子形成は様々な環境条件に対して耐久性を獲得するための生理的・形態的応答と解釈した方がより妥当であり、これまでの伝統的な仮説は再検討を要すると言えよう。

休眠胞子が様々な環境条件に対する耐久性を獲得していて、条件が回復したときにすばやく発芽する特性を持っていれば、その種は広範囲に分布を広げることができるであろう。本研究は、休眠胞子がこのような性質を持つことの一端を示した。*Chaetoceros* や *Thalassiosira* のような珪藻類が世界中の海域に分布する理由は、休眠胞子形成を生態戦略として利用しているからなのかもしれない。

2) 今後の展望

本研究の過程で、これから取り組まれるべき課題が幾つか抽出されてきている。

栄養欠乏培養により、*Chaetoceros* 11種の胞子形成特性を調べた結果は (Table 2.2)、この条件で胞子形成を行いにくい種の存在を表している。しかし、分離したいずれの種も休眠胞子形成種である。また、*Ch. anastomosans* の休眠胞子形成が窒素欠乏では見られず、しかし高塩分で窒素欠乏になると胞子形成

が誘導されている（Fig. 2.6）。これらの実験結果は、未知の胞子形成の誘導因子が種々存在していることを暗示している。休眠胞子形成を誘導する環境因子は珪藻類の動態を予測・把握する上で重要であり、今後の精査が望まれる。

光合成色素の分析結果からも今後の研究課題が見いだせる。Fig. 6.2に見られるように、栄養細胞、栄養欠乏細胞、休眠胞子の光合成色素組成を比較すると、休眠胞子では前2者に比べてChl. *a* のピークが高く、Phaeophorbide *a* 様物質のピークが低くなっている。この結果には再現性があり、休眠胞子中でのクロロフィラーゼの活性の低さを示しているものと思われる。これは栄養細胞と休眠胞子の生理的な活性の違いを表すデータといえるが、詳細は今後の検討に委ねられる。

休眠胞子形成途中の細胞のヌクレオチド組成を分析したところ、未知のヌクレオチド様物質の存在が確認されている（Fig. 6.3）。この物質は栄養細胞や休眠胞子からは検出されず、休眠胞子形成途中の細胞にのみ見られた。したがって、休眠胞子の形成過程にのみ起こる特殊な代謝活動が存在していることが推測される。このことと、紫外線を吸収する・TCA抽出性である・イオンペアクロマトの溶出位置、といった物理化学的特徴から考えると、この物質は糖ヌクレオチドの可能性が指摘できる。耐久性の高い細胞壁の構築や、貯蔵性多糖の合成のために胞子形成に伴う新たな代謝活動が起こることは十分に予想されるので、この物質の同定と胞子形成に伴うダイナミクスの解明が待たれる。

本研究は、代謝物質の含量および組成の面からも休眠胞子の役割の解析が可能であるという道筋を示した。しかし、休眠胞子の形成に焦点を絞ったため、胞子の熟成、発芽に関連した代謝物質の含量・組成を調べるには至らなかった。現場水域では栄養細胞よりも休眠期細胞の期間の方が長い種も見られることから、胞子形成直後だけでなく、形成後長期間経過した休眠胞子の生理生化学的特徴を調べることも重要な課題である。

今後は休眠胞子が現場水域における種の維持・季節的遷移・分布特性に果たしている役割を明らかにするために、休眠胞子の熟成に伴う代謝機構の変化、休眠胞子の発芽に必要な環境条件、休眠胞子の発芽に伴う代謝物質の含量・組成の変化など、休眠胞子の形成、熟成、発芽に関連した生活史の各段階で起こっている事象の全体像を多くの種について解明してゆく必要がある。

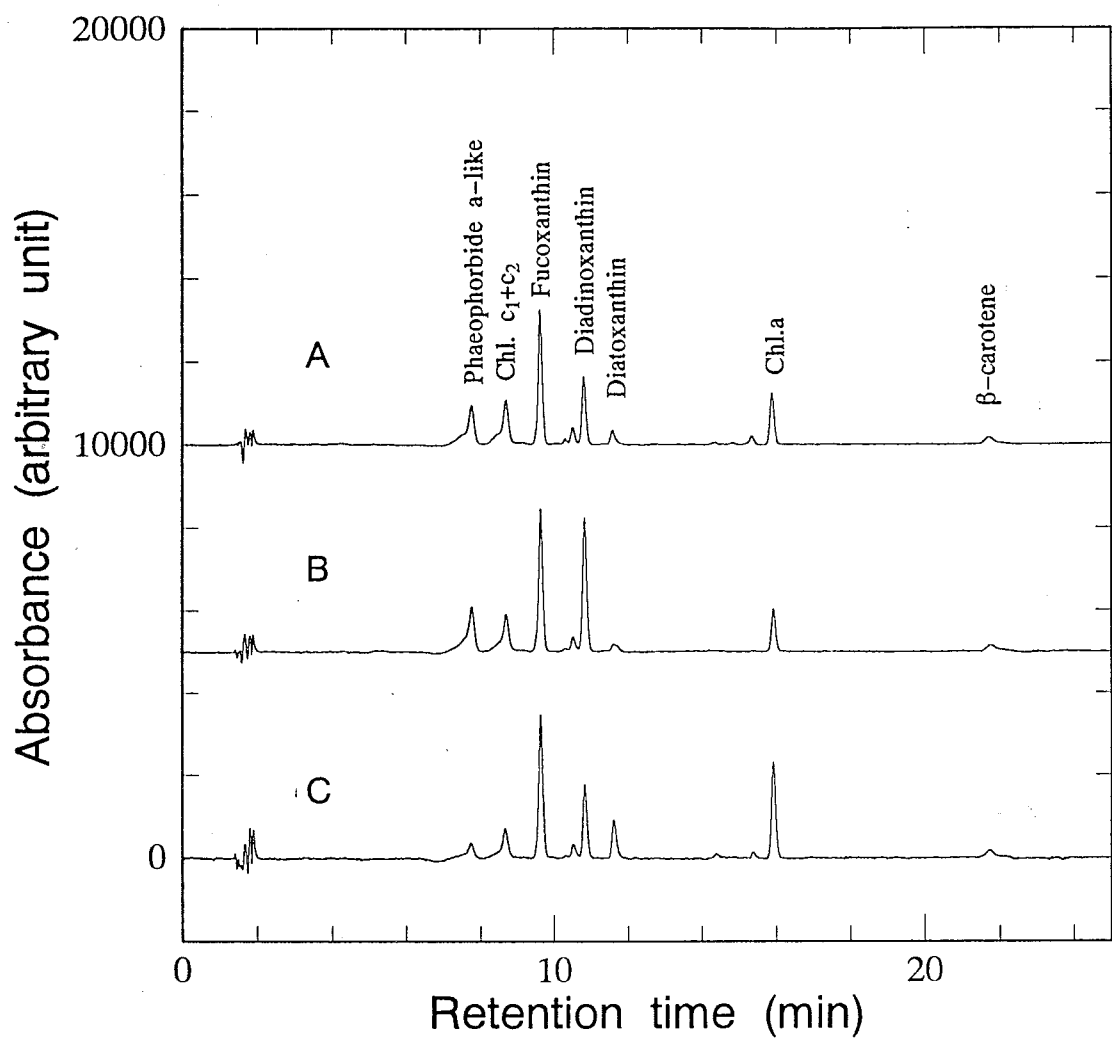


Figure 6. 2. Typical chromatograms of photosynthetic pigments extracted from the various cell types. (A) Exponential growing vegetative cells; (B) nutrient starved cells in nitrogen and silicate limited culture; (C) resting spores in nitrogen limited culture.

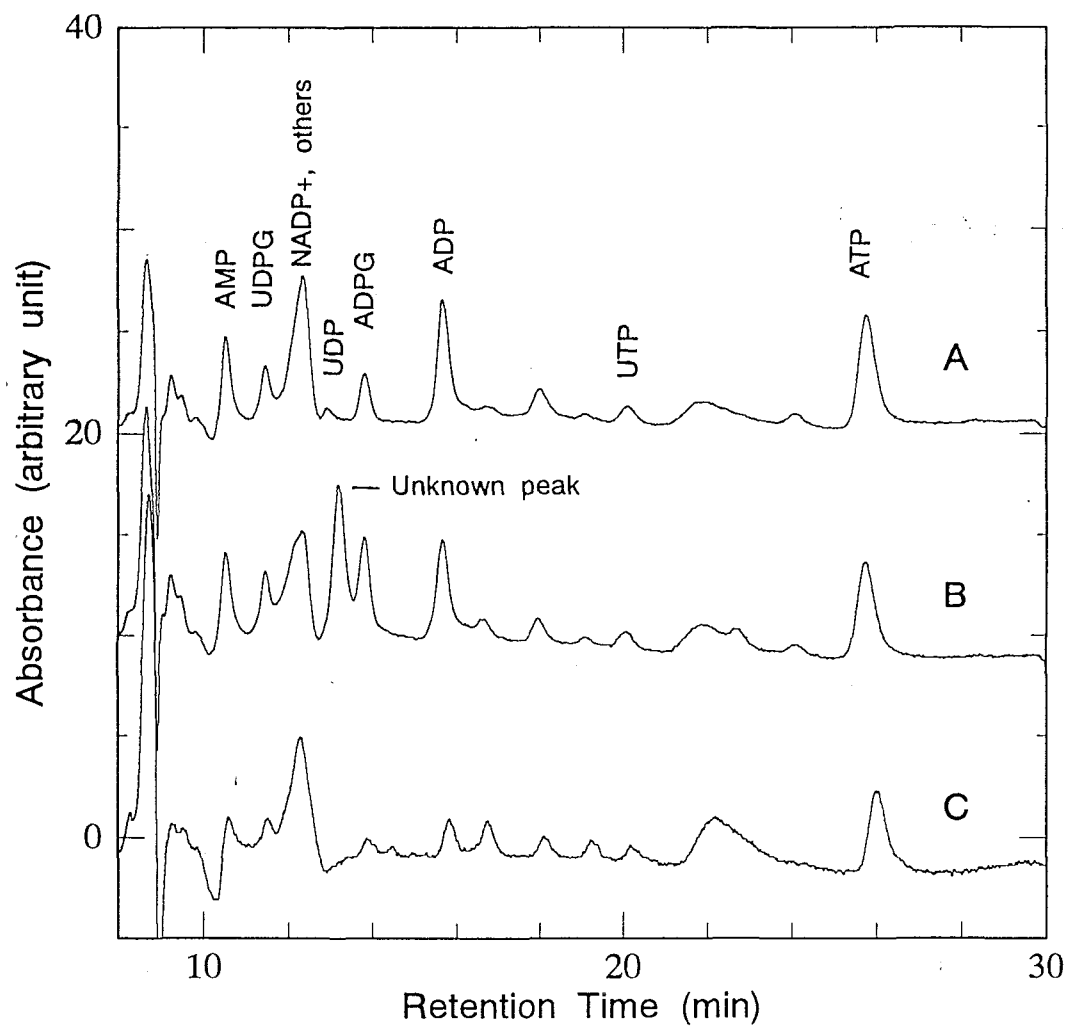


Figure 6. 3. Typical chromatograms of nucleotides extracted from the various cell types. (A) Exponential growing vegetative cells; (B) cells in the middle of spore formation; (C) resting spores.

謝辞

鎌谷明善 教授は滞りがちになる私の研究を辛抱強く見守られ、困難に直面したときには的確な指示を出され、また、私の原稿の読みにくい部分を鋭く指摘し修正して下さいました。この論文は先生のご指導を賜ることなしでは決して完成にはこぎ着けなかったと思います。先生のご指導に心からの感謝の意を表します。

有賀祐勝 教授（藻類学）には、専門用語の用法について詳しくご指導頂き、また、今後の研究の発展に有益な示唆を頂きました。大槻 晃 教授（海洋環境保全学）には内容の誤りや、休眠孢子形成の生態学的意義についての鋭い指摘を頂きました。石丸 隆 教授（浮遊生物学）には本論文の校閲を頂いたばかりでなく、培養実験の進め方や光合成色素の分析法に関しても有益な助言を頂きました。海洋化学研究室の前田 勝 助教授（海洋化学）からは実験データの解釈についての鋭いコメントを頂きました。また、培養用海水の確保を始めとして、研究上の多くの協力も頂きました。弘前大学理学部の沢田信一 教授（植物生理学）には第5章を粗稿の段階でお読みいただき、議論の誤りの指摘と、建設的なコメントを頂きました。

各先生方の建設的な暖かいご指導に心から感謝申し上げます。

資源環境研究所の鈴木昌弘 博士（生物地球化学）には、様々なコメントや研究上必要な情報の提供などを頂きました。海洋化学研究室の皆様にも様々な研究上の支援、協力を頂きました。とりわけ修士課程の西尾純一君には培養株の維持を始めとして、培養実験に種々の協力をしていただきました。学部学生の間瀬弘之君は、クロマトインテグレータのデータをコンピュータに転送するプログラムの作成に才を発揮してくれました。

これらの方々に心からの感謝の意を表します。

都立南多摩高等学校の廣瀬 登 教諭（化学）は私の研究上の恩師であり、私の基礎的な実験技術は先生の指導により育てられました。心から感謝申し上げます。

最後に、私の学生生活を常に肯定的に見守り、経済的支援を惜しまなかった両親に感謝の意を表します。

引用文献

- Belay, A. and Fogg G. E. (1978): Photoinhibition of photosynthesis in *Asterionera formosa* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 14: 341-347
- Bieleski R. L. (1968) Effect of phosphorus deficiency on levels of phosphorus compounds in *Spirodela*. Plant Physiol. 43: 1309-1316
- Bieleski R. L. (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 225-252
- Bieleski R. L., Ferguson I. B. (1983) Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: Lauchli A, Bieleski, RL (eds) Encyclopedia of plant physiology, New Series, Vol. 15A. Springer-Verlag, Berlin and New York. p. 422-449
- Bienfang P. K., Harrison P. J., Quarmby L. M. (1982) Sinking rate response to depletion of nitrate, phosphate and silicate in four marine diatoms. Mar. Biol. 67: 295-302
- Bidigare R. R. (1991): Analysis of algal chlorophylls and carotenoids. In: Hurd D. C., Spencer D. W. (eds.) Marine particles: Analysis and characterization. Geophysical Monographs 63. AGU.
- Billett D. S. M, Lampitt R. S., Rice A. L., Mantoura R. F. C. (1983) Seasonal sedimentation of phytoplankton to the deep-sea benthos. Nature 302: 520-522
- Binder B. J., Anderson D. M. (1990) Biochemical composition and metabolic activity of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) resting cysts. J. Phycol. 26: 289-298
- Brzezinski M. A. (1985) The Si:C:N ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables. J. Phycol. 21: 347-357
- Chu S. P., Kuo Y. C. (1957) Studies on the *Chaetoceros* Ehrenberg from the fishing ground of the mackerel, *Pneumatophorus japonicus* (Houttuyn), off the Shantung coast from Chefoo to Weihai. Part I. A systematic study. Oceanol. Limnol. sin. 1:27-94
- Crawford R. M. (1973) The protoplasmic ultrastructure of the vegetative cell of *Melosira varianse* C. A. Agardh. J. Phycol. 9: 50-61
- Cullen J. J., Lesser M. P. (1991) Inhibition of photosynthesis by ultraviolet radiation as a function of dose and dosage rate: results for a marine diatom. Mar. Biol. 111: 183-190

- Cunningham F. X. Jr, Schiff J. A. (1986) Chlorophyll-protein complexes from *Euglena gracilis* and mutants deficient in chlorophyll b. I. Pigment composition. *Plant Physiol.* 80: 223-230
- Cupp E. E. (1943) Marine plankton diatoms of the west coast of North America. *Bull. Scripps Instn. Oceanogr. tech. Ser.* 5: 1-238
- Cushing D. H. (1975) Marine ecology and fisheries. Cambridge University Press, Cambridge.
- Davis C. O., Hollibaugh J. T., Seibert D. L. R., Thomas W. H., Harrison P. J. (1980) Formation of resting spores by *Leptocylindrus danicus* (Bacillariophyceae) in a controlled experimental ecosystem. *J. Phycol.* 16: 296-302
- Demers S., Roy S., Gagnon R., Vignault C. (1991) Rapid light-induced changes in cell fluorescence and in xanthophyll-cycle pigments of *Alexandrium excavetum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): a proton-protection mechanism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 76: 185-193
- Demmig B., Winter K., Kruger A., Czygan F-C. (1987) Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. *Plant Physiol.* 84: 218-224
- Demmig-Adams B., Winter K., Kruger A., Czygan F-C. (1989) Zeaxanthin synthesis, energy dissipation, and photoprotection of photosystem II at chilling temperatures. *Plant Physiol.* 90: 894-898
- Doucette G. J., Fryxell G. A. (1983) *Thalassiosira antarctica*: vegetative and resting stage chemical composition of an ice-related marine diatoms. *Mar. Biol.* 78: 1-6
- Drebes G. (1966) On the life cycle of the marine plankton diatom, *Stephanopyxis palmeriana*. *Helgol. Wiss. Meeresunter* 13: 101-115
- Durbin E. G. (1978) Aspects of the biology of resting spores of *Thalassiosira nordenskioldii* and *Detonula confervacea*. *Mar. Biol.* 45: 31-37
- Eilertsen H. C., Sandberg S., Tollefsen H. (1995) Photoperiodic control of diatom spore growth: a theory to explain the onset of phytoplankton blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 116: 303-307
- French F. W., Hargraves P. E. (1980) Physiological characteristics of plankton diatom resting spores. *Mar. Biol. Lett.* 1: 185-195
- French F. W., Hargraves P. E. (1985) Spore formation in the life cycles of the diatoms *Chaetoceros diadema* and *Leptocylindrus danicus*. *J. Phycol.* 21: 477-483

- 藤伊 正 (1975) 植物の休眠と発芽. 東京大学出版会. 104 pp., 東京
- Furnas M. (1978) Influence of temperature and cell size on the division rate and chemical content of the diatom *Chaetoceros curvisetum* Cleve. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 34: 97-109
- 古谷 研 (1996) 海洋の一次生産. 所収: 月刊海洋 (号外 No. 10) 海洋植物プランクトン—その生理・生態—, pp. 146-155
- Garrison D. L. (1981) Monterey Bay phytoplankton. II. Resting spore cycles in coastal diatom populations. J. Plankton Res. 3: 137-156
- Garrison D. L. (1984) Planktonic diatoms. In: Steidinger KA, Walker LM (ed) Marine plankton life cycle strategies. CRC Press, Florida, p. 1-17
- Gander J. E. (1976) Mono- and Oligosaccharides. In: Bonner J., Varner J. E. (eds) Plant Biochemistry (3rd edition). Academic Press. London. p. 337-380
- Geider R. J., Roche J. L., Greene R. M., Olaizola M. (1993) Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. J. Phycol. 29: 755-766
- Goldman J. C., Hansell D. A., Dennett M. R. (1992) Chemical characterization of three large oceanic diatoms: potential impact on water column chemistry. Mar. Ecol. Prog. Ser. 88: 257-270
- Gran H. H. (1897) Botanik. Protophyta: Diatomaceae, Silicoflagellata og Cilioflagellata. Den Norske Nordhavs-Expedition 1876-1878 7(24): 1-36
- Gran H. H. (1912) Pelagic plant life. In: Murray J, Hort J (eds) The depth of the ocean. MacMillan, London, pp 307-386
- Guillard R. R. L., Ryther J. H. (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8: 229-239
- Guillard R. R. L., Kilham P. (1977) The ecology of marine planktonic diatoms. In: Werner D. (ed.) The biology of diatoms. University of California Press 498 pp.
- Hager A. (1975) Die reversiblen, lichtabhängigen Xanthophylls im Chloroplasten. Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. 88: 27-44
- Handa N. (1969) Carbohydrate metabolism in the marine diatom *Skeletonema costatum*. Mar. Biol. 4: 208-214
- Hall J. R., Hodges T. K. (1966) Phosphorus metabolism of germinating Oat seeds. Plant Physiol. 41: 1459-1464

- Hargraves P. E., French F. W. (1975) Observations on the survival of resting spores. *Nova Hedwigia Beiheft* 53: 229-238
- Hargraves P. E. (1976) Studies on marine plankton diatoms. II. Resting spore morphology. *J. Phycol.* 12: 118-128
- Hargraves P. E. (1979) Studies on marine plankton diatoms IV. Morphology of *Chaetoceros* resting spores. *Nova Hedw. Beih.* 64: 99-120
- Hargraves P. E., French F. W. (1983) Diatom resting spores: significance and strategies. In: Fryxell GA (ed) *Survival strategies of the algae*. Cambridge University Press, New York, p. 49-68
- Harrison P. J., Conway H. L., Holmes R. W., Davis C. O. (1977) Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. III. Cellular chemical composition and morphology of *Chaetoceros debilis*, *Skeletonema costatum*, and *Thalassiosira gravida*. *Mar. Biol.* 43: 19-31
- Hollibaugh J. T., Seibert D. L., Thomas W. H. (1981) Observations on the survival and germination of resting spores of three *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) species. *J. Phycol.* 17: 1-9
- Hoshaw R. W., Rosowski J. R. (1973) Isolation and purification: methods for microscopic algae. In: Stein, J. R. (ed.) *Handbook of phycological methods: culture and growth measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 53-68
- Ikari J. (1926) On some *Chaetoceras* of Japan. I. *Bot. Mag. Tokyo* 40: 517-534
- 今井一郎 (1995) 生活史戦略の観点から見た赤潮防除の可能性. 1995年度日本海洋学会春季大会講演要旨集. p. 467, 東京.
- 今井一郎・板倉 茂・伊藤克彦 (1990) 播磨灘および北部広島湾の海底泥中における珪藻類の休眠細胞の分布. 沿岸海洋研究ノート. 28: 75-84
- 今堀和友・山川民夫 (監修, 1984) 生化学辞典. 東京化学同人. 東京.
- 井上貴史・谷口 旭 (1995) 女川湾における浮遊珪藻類 *Thalassiosira nordenskioeldii* の個体群動態. 1995年度日本海洋学会春季大会講演要旨集. p. 395, 東京.
- 石丸 隆・藤田善彦 (1985) *In vivo* クロロフィル蛍光解析による植物プランクトンの光合成の測定. 所収: 日本微生物学会 (編), 微生物の生態13, 学会出版センター. pp. 35-45, 東京
- Ishizaka J., Kaichi M., Takahashi M. (1987) Resting spore formation of *Leptocylindrus danicus* (Bacillariophyceae) during short time-scale upwelling and its significance as predicted by a simple model. *Ecol. Res.* 2:

- 板倉 茂 (1995) 個体群動態と休眠期細胞の役割. 1995年度日本海洋学会春季大会講演要旨集. p. 459, 東京
- 板倉 茂・山口峰生・今井一郎 (1993) 培養条件下における浮遊性珪藻 *Chaetoceros didymus* var. *protuberans* の休眠孢子形成と発芽. 日本水産学会誌. 59: 807-813
- 巖佐耕三 (1976) 珪藻の生物学. 東京大学出版会. 東京
- Jeffrey S. W. (1974) Profiles of photosynthetic pigments in the ocean using thin layer chromatography. Mar. Biol. 26: 101-110
- Jeffrey S. W., Hallegraeff G. M. (1987) Chlorophyllase distribution in ten classes of phytoplankton: a problem for chlorophyll analysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 35: 293-304
- Jeffrey S. W., Humphrey G. F. (1975) New spectroscopic equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanz. 167: 191-194
- Jensen R. G., Bassham J. A. (1966) Photosynthesis by isolated chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56: 1095-1101
- 葛西身延・沢田信一 (1995) 光合成のソース-シンク制御機構とリン酸. 化学と生物. 33: 198-206
- Ketchum B. H. (1939) The development and restoration of deficiencies in the phosphorus and nitrogen composition of unicellular plants. J. Cell. comp. Physiol. 13: 373-381
- Khym J. X. (1975) An analytical system for rapid separation of tissue nucleotides at low pressures on conventional anion exchanges. Clin. Chem. 21: 1245-1252
- Koroleff F. (1983) Determination of phosphorus. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds) Methods of seawater analysis. Verlag Chemie, Weinheim. p. 125-139
- Kuenzler E. J., Ketchum B. H. (1962) Rate of phosphorus uptake by *Phaeodactylum tricornutum*. Biol. Bull. mar. biol. lab., Woods Hole 123: 134-145
- Kuwata A., Hama T., Takahashi M. (1993) Ecophysiological characterization of two life forms, resting spores and resting cells, of a marine planktonic diatom, *Chaetoceros pseudocurvisetus*, formed under nutrient depletion. Mar. Ecol. Prog. Ser. 102: 245-255
- Kuwata A., Takahashi M. (1990) Life-form population responses of a marine

- planktonic diatom, *Chaetoceros pseudocurvisetus*, to oligotrophication in regionally upwelled water. Mar. Biol. 107: 503-512
- 桑田 晃・高橋正征 (1992) 貧栄養環境下における沿岸性中心型珪藻 *Chaetoceros pseudocurvisetus* の休眠細胞形成とその生存期間. 1992年度日本海洋学会春季大会講演要旨集. p. 316, 東京
- Latasa M., Berdalet E. (1994) Effect of nitrogen or phosphorus starvation on pigment composition of cultured *Heterocapsa* sp. J. Plankton Res. 16: 83-94
- Latasa M. (1995) Pigment composition of *Heterocapsa* sp. and *Thalassiosira weissflogii* growing in batch cultures under different irradiances. Sci. Mar. 59: 25-37
- Lirdwitayaprasit T., Okaichi T., Montani S., Ochi T., Anderson D. M. (1990) Changes in cell chemical composition during the life cycle of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae). J. Phycol. 26: 299-306
- Lund J. W. G., Kilping C., Le Cren E. D. (1958) The inverted microscope method of estimating algal numbers, and the statistical basis of estimation by counting. Hydrobiologia 11: 143-170
- Mackereth F. G. (1953) Phosphorus utilization by *Asterionella formosa* Hass. J. exp. Bot. 4: 296-313
- McQuoid M. R., Hobson L. A. (1996) Diatom resting stages. J. Phycol. 32: 889-902
- Marone T. C., Garside C., Anderson R., Roels O. A. (1973) The possible occurrence of photosynthetic microorganisms in deep-sea sediments of the north Atlantic. J. Phycol. 9: 482-488
- Marone T. C., Chervin M. B. (1979) The production and fate of phytoplankton size fractions in the plume of the Hudson River, New York Bight. Limnol. Oceanogr. 24: 683-696
- Marschner H. (1986) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego
- Martin J. H., Knauer G. A., Karl D. M., Broenkow W. W. (1987) VERTEX: carbon cycling in the northeast Pacific. Deep-Sea Res. 34: 267-285
- Menzel D. W., Corwin N. (1965) The measurement of total phosphorus in seawater based on the liberation of organically bound fractions by persulfate oxidation. Limnol. Oceanogr. 10: 280-282
- Miyata K., Hattori A. (1986) A simple fractionation method for determination of phosphorus components in phytoplankton: application to natural populations

- of phytoplankton in summer surface waters of Tokyo Bay. J. Oceanogr. Soc. Japan 42: 255-265
- Miyata K., Hattori A., Ohtsuki A. (1986) Variation of cellular phosphorus composition of *Skeletonema costatum* and *Heterosigma akashiwo* grown in chemostats. Mar. Biol. 93: 291-297
- Moal J., Coz J. R., Samain J. F., Daniel J. Y. (1989) Nucleotides in bivalves: extraction and analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC). Comp. Biochem. Physiol. 93B: 307-316
- Mukherji S., Dey B., Paul A. K., Sircar S. M. (1971) Changes in phosphorus fractions and phytase activity of rice seeds during germination. Physiol. Plant. 25: 94-97
- Murphy J., Riley J. P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta 27: 31-36
- Nakatani H. Y., Barber J. (1977) An improved method for isolating chloroplasts retaining their outer membranes. Biochim. biophys. Acta 461: 510-512
- Nelson D. M., Treguer P., Brzezinski M. A., Leynaert A., Queguiner B. (1995) Production and dissolution of biogenous silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. Global Biogeochem. Cycle 9: 359-372
- 西村光雄 (1987) 光合成. 岩波書店. 東京
- 西島敏隆・深見公雄 (1993) ラフィド藻類及び珪藻類. 所収: 吉田陽一 (編) 水域の窒素・リン比と水産生物. 厚生社厚生閣. p. 20-28, 東京
- 乗木新一郎 (1996) 沈降粒子束の変動と粒子の有機炭素無機炭素比. 所収: 月刊海洋 (号外 No. 11) 海洋物質循環と地球環境, pp. 82-88
- Noriki S., Tsunogai S. (1986) Particulate fluxes and major components of settling particles from sediment trap experiments in the Pacific Ocean. Deep-Sea Res. 33: 903-912
- Odate T. (1987) Temporal and horizontal distribution of the diatom community during the spring bloom in Funka Bay, southern Hokkaido. Bull. Plankton Soc. Japan 34: 33-42
- Odate T., Maita Y. (1990) Seasonal distribution and vertical flux of resting spores of *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) species in the neritic water of Funka Bay, Japan. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 41: 1-7
- Okamura K. (1907) Some *Chaetoceras* and *Peragallia* of Japan. Bot. Mag. Tokyo 21: 89-106

- Oku O. , Kamatani A. (1995) Resting spore formation and phosphorus composition of the marine diatom *Chaetoceros pseudocurvisetus* under various nutrient conditions. Mar. Biol. 123: 393-399
- Oku O. , Kamatani A. (1997) Resting spore formation of the marine planktonic diatom *Chaetoceros anastomosans* induced by high salinity and nitrogen depletion. Mar. Biol. 127: 515-520
- Parsons T. R. , Takahashi M. , Hargraves B. (1984) Biological oceanographic processes (3rd ed.). Pergamon Press, Oxford.
- Pitcher G. C. (1986) Sedimentary flux and the formation of resting spores of selected *Chaetoceros* species at two sites in the southern Benguela system. South Afr. J. Mar. Sci. 4: 231-244
- Pitcher G. C. (1990) Phytoplankton seed populations of the Cape Peninsula upwelling plume, with particular reference to resting spores of *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) and their role in seeding upwelling waters. Estuarine Coastal Shelf Sci. 31: 283-301
- Platt R. (1971) Water -the wonder of life. Prentice-Hall, New Jersey
- Powles S. B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 15-44
- Rines J. E. B. , Hargraves (1987) The seasonal distribution of the marine diatom genus *Chaetoceros* Ehr. in Narragansett Bay, Rhode Island (1981-1982). J. Plankton Res. 9: 917-133
- Rines J. E. B. , Hargraves P. E. (1988) The *Chaetoceros* Ehrenberg (Bacillariophyceae) Flora of Narragansett Bay, Rhode Island, U. S. A. , Bibliotheca Phycologica 79, J. Cramer, Berlin/Stuttgart
- Riper D. M. , Owens T. G. , Falkowski P. G. (1979) Chlorophyll turnover in *Skeletonema costatum*, a marine plankton diatom. Plant Physiol. 64: 49-54
- Round F. E. , Crawford R. M. , Mann D. G. (1990) The diatoms. Cambridge Univ. Press
- Sakshaug E. , Demers S. , Yentsch C. M. (1987) *Thalassiosira oceanica* and *T. pseudonana*: two different photoadaptational responses. Mar. Ecol. Prog. Ser. 41: 275-282
- Sanders J. G. , CibiK S. J. (1985) Reduction of growth rate and resting spore formation in a marine diatom exposed to low levels of cadmium. Mar. Environ. Res. 16: 165-180

- Sawada S., Hasegawa Y., Kasai M., Sasaki, M. (1989) Photosynthetic electron transport and carbon metabolism during altered source/sink balance in single rooted soybean leaves. *Plant and Cell Physiol.* 30: 691-698
- Sawada S., Usuda H., Hasegawa Y., Tsukui T., (1990) Regulation of ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase activity in response to changes in the source/sink balance in single-rooted soybean leaves: The role of inorganic orthophosphate in activation of the enzyme. *Plant and Cell Physiol.* 31: 697-704
- Smetacek V. S. (1985) Role of sinking in diatom life-history cycles: ecological, evolutionary and geological significance. *Mar. Biol.* 84: 239-251
- Strickland J. D. H., Parsons T. R. (1968) A practical hand book of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.* 167: 1-311
- Sugawara K. (1969) On the preparation of CSK standards for marine nutrients analysis. SCOR UNESCO, ICUC 56 pp. Tokyo
- Suzuki R., Fujita Y. (1986) Chlorophyll decomposition in *Skeletonema costatum*: a problem in chlorophyll determination of water sample. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28: 81-85
- Suzuki R., Takahashi M., Furuya., Ishimaru T. (1993) Simplified technique for the rapid determination of phytoplankton pigments by reverse-phase High-Performance Liquid chromatography. *J. Oceanogr.* 49: 571-580
- 谷口 旭 (1991) 植物プランクトンの主要分類群 (13). *海洋と生物.* 13: 402-406
- 高橋孝三・久道研一・梁田 満・米田義昭 (1996) 海洋植物プランクトン生産性の季節変動. 所収: 月刊海洋 (号外 No. 11) 海洋物質循環と地球環境, pp. 109-115
- 高野秀昭 (1990) *Chaetoceros pseudocurvisetus* Mangin. 所収: 福代康夫・千原光雄・高野秀昭・松岡数充 (編) 日本の赤潮生物—写真と解説—. 内田老鶴圃. pp. 290-291
- Thayer S. S., Bjorkman O. (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynthesis Res.* 23: 331-343
- 千原光雄・西澤一俊 (1979) 藻類研究法. 共立出版. 東京.
- 白田秀明 (1994) リン酸は光合成にどのような影響を与えるか. *化学と生物.* 32: 148-151
- Valente R. M., Cosper E. M., Wurster C. F. (1987) Interactive effects of copper and silicic acid on resting spore formation and viability in a marine diatom. *J. Phycol.* 23: 156-163

- von Bodungen B., Smaetacek V. S., Tilzer M. M., Zeitzschel B. (1986) Primary production and sedimentation during spring in the Antarctic Peninsula region. Deep-Sea Res. 33: 177-194
- von Stosch H. A., Theil G, Kowallik K. (1973) Entwicklungsgeschichten Untersuchungen an zentrischen Diatomeen. V. Bau und Lebenszyklus von *Chaetoceros didymum*, mit Beobachtungen über einige andere Arten der Gattung. Helgol. Wiss. Meeresunter 25: 384-445
- Walker G. S., Coveney M. F., Klug M. J., Wetzel R. G. (1986) Isocratic HPLC analysis of adenine nucleotides in environmental samples. J. Microbiol. Methods 5: 255-264
- Werner D. (1977) Introduction with a note on taxonomy. In: Werner D. (ed.) The biology of diatoms. University of California Press 498 pp.
- Wright S. W., Jeffrey S. W., Mantoura R. F. C., Llewellyn C. A., Bjornland T., Repta D., Welschmeyer N. (1991) Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. 77: 183-196